

ความแตกต่างของการสร้างอินเทอร์เน็ตวิจิน 17 ภายในเมล็ดเลือดขาวซีดี 4 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโทเจน
ในหลอดทดลองของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี



นาย วิรัช เมฆอนันต์วัช

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

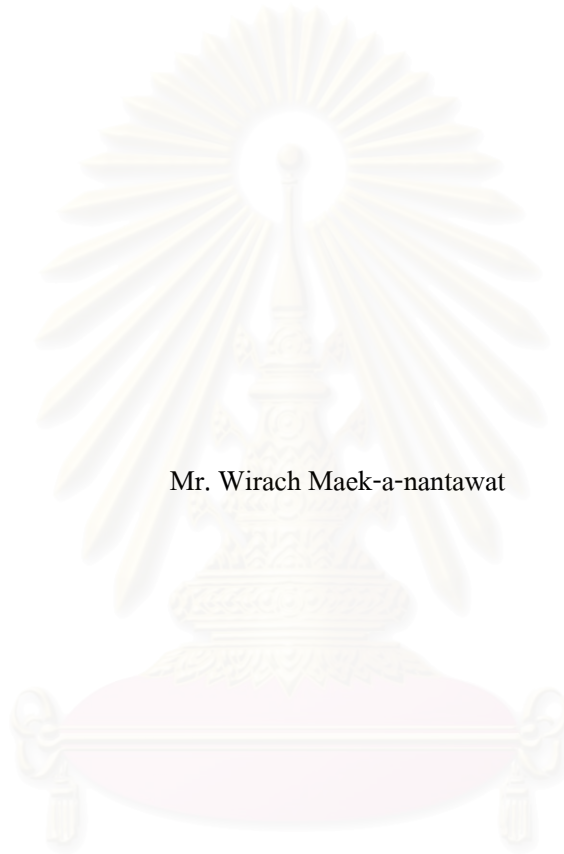
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6752-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE DIFFERENCES OF IN VITRO MITOGEN STIMULATED INTRACELLULAR IL-17 EXPRESSION
OF CD4+ T CELLS FROM HIV INFECTED PATIENTS
AND HIV SERONEGATIVE HEALTHY DONORS



Mr. Wirach Maek-a-nantawat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic year 2004

ISBN 974-17-6752-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความแตกต่างของการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 17 ภายในเม็ดเลือดขาว
ซีดี 4 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโทเจนในหลอดทดลองของผู้ติดเชื้อ
เอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี
โดย นาย วิรัช เมฆอนันต์ธวัช
สาขาวิชา อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกียรติ รักรุ่งธรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เจตทะนง แก้วสงคราม

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณะบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกียรติ รักรุ่งธรรม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ เจตทะนง แก้วสงคราม)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ฉันทชาย สิริพิพันธุ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. ญักุฎิยา หิรัญกาญจน์)

วิรัช มณอนันต์รัช : ความแตกต่างของการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 17 ภายในเม็ดเลือดขาวซีดี 4 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย
ไมโทเจนในหลอดทดลองของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี (THE DIFFERENCES OF
IN VITRO MITOGEN STIMULATED INTRACELLULAR IL-17 EXPRESSION OF CD4+ T CELLS IN HIV
INFECTED PATIENTS AND HIV SERONEGATIVE HEALTHY DONORS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. นพ. เกียรติ
รักษุ์ธรรม, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศศ. นพ. เจตทะนง แก้วสงคราม ; 108 หน้า. ISBN 974-17-6752-8.

อินเตอร์ลิวคิน 17 (IL-17) เป็นไซโตไคน์ที่ค้นพบเมื่อ 10 ปีก่อน ซึ่งถือว่าเป็น proinflammatory cytokine
ชนิดหนึ่งสร้างจาก CD4+ T cells เป็นส่วนใหญ่ มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่มายัง
บริเวณเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล จึงมีความสำคัญในการป้องกันและทำลายเชื้อโรค
โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย การติดเชื้อเอชไอวีส่งผลให้มีการทำลายเซลล์เป้าหมายหลักคือ CD4+ T cells จึงเป็นไปได้ว่า
ผู้ติดเชื้อเอชไอวีและมีความผิดปกติของจำนวน CD4+ T cells น่าจะมีความผิดปกติของ IL-17 expression ภายใน
CD4+ T cells อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของ IL-17 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่อย่างใด การวิจัยนี้
จึงมีวัตถุประสงค์ในการตรวจหา IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells โดยวิธี intracellular cytokine staining
(ICCS) หลังการกระตุ้นด้วย mitogens ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีเปรียบเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี

การศึกษานี้มีอาสาสมัครเข้าร่วมทั้งหมด 80 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่มโดยมีผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่แสดงอาการทาง
คลินิก 40 คน อายุเฉลี่ย 36.28 ± 9.05 ปี แตกต่างจากอาสาสมัครสุขภาพดีซึ่งมีอายุเฉลี่ย 29.68 ± 8.98 ปี ลักษณะ
พื้นฐานที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญได้แก่ อายุ ($p=0.001$) และ CD4+ T cells count ซึ่งกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีมี
ระดับสูงกว่า (622.5 พิตัย $294-1008$ VS 218 พิตัย $32-820$, $p<0.0001$) ผลการศึกษาพบว่าร้อยละของ IL-17
expression ภายใน CD4+ T cells ทั้งก่อนและหลังกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ที่ 4 ชั่วโมงในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีมี
ค่าสูงกว่าในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่ามัธยฐาน 0.68 VS 0.12 และ 1.45 VS 0.645
ตามลำดับ, $p<0.0001$) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ผลในกลุ่ม CD4- T cells (CD8+ T cells, CD4-CD8- T cells) พบว่าร้อยละ
ของ IL-17 expression เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ในผู้ติดเชื้อเอชไอวียังให้ค่าสูงกว่าอาสาสมัคร
สุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (ค่ามัธยฐาน 0.92 VS 0.09 , $p<0.0001$) แม้ว่าหลังกระตุ้นร้อยละของ IL-17 expression
ภายใน CD4+ T cells จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ($p<0.0001$) แต่
ค่าที่เพิ่มขึ้นหลังกระตุ้นจากภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นในผู้ติดเชื้อเอชไอวีเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดีมีค่าไม่แตกต่างกัน
อย่างมีนัยสำคัญ (0.67 VS 0.43 , $p=0.288$) ผลการวิเคราะห์ตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ อายุ, เพศ, CD4+ T cell count,
CD4/CD8 ratio, IFN- γ expression ไม่พบที่มีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงกับการเปลี่ยนแปลงของ IL-17 expression
ภายใน CD4+ T cells แต่อย่างใด

IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย
PMA/Ionomycin มีค่าสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าภาวะติดเชื้อเอชไอวีเรื้อรังก่อให้เกิดการ
กระตุ้น CD4+ T cells ให้มีการสร้าง IL-17 อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น IL-17 จึงเป็นไซโตไคน์อีกชนิดหนึ่งที่บ่งถึงภาวะ
กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวีแม้ในระยะที่ยังไม่แสดงอาการทางคลินิกใด ๆ ก็ตาม

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิติ
สาขาวิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

467 47871 30 : MAJOR MEDICINE (ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY)

KEY WORDS : IL-17/ T HELPER CELLS/ HIV/ AIDS

WIRACH MAEK-A-NANTAWAT: THE DIFFERENCES OF IN VITRO MITOGEN STIMULATED INTRACELLULAR IL-17 EXPRESSION OF CD4+ T CELLS FROM HIV INFECTED PATIENTS AND HIV SERONEGATIVE HEALTHY DONORS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KIAT RUXRUNGTHAM, M.D., ASST. PROF. JETTANONG KLAEWSONGKRAM, M.D. 108 pp. ISBN 974-17-6752-8.

Interleukin 17 (IL-17), the recently discovered proinflammatory cytokine, is produced mainly by activated CD4+ T cells. IL-17 induces cytokines and chemokines that are important in neutrophil recruitment, activation and differentiation. In immunocompromised hosts including AIDS, increased incidence of some bacterial infections has been observed. HIV infection eventually leads to CD4+ T cells depletion. Thus, a reduction of IL-17 expression in CD4+ T cells can possibly be postulated. In addition, there is no information about IL-17 expression in CD4+ T cells among HIV-infected individuals. This study is aimed to describe IL-17 expression in stimulated CD4+ T cells by intracellular cytokine staining (ICCS) among HIV infected patients and compare them to data from healthy volunteers.

A total of 80 volunteers (40 asymptomatic HIV infected and 40 healthy HIV seronegative volunteers) were enrolled in this study. Mean age \pm SD of 36.28 ± 9.05 years in HIV group was statistically significant higher than mean age \pm SD of 29.68 ± 8.98 years in healthy group ($p=0.001$). Other characteristic features of each group were comparable except CD4+ cell count in HIV group which was significantly lower than healthy volunteers (622.5 , ranged $294-1008$ VS 218 , ranged $32-820$, $p<0.0001$). The result of IL-17 expression in unstimulated and stimulated CD4+ T cells among HIV infected individuals by PMA/Ionomycin at 4 hours showed significantly higher percentage than those among healthy volunteers (0.68 VS 0.12% in unstimulated CD4+ T cells and 1.45 VS 0.645% in stimulated CD4+ T cells, $p<0.0001$). Also, the stimulated CD4+ T cells by PMA/Ionomycin in HIV infected individuals can express the significantly higher proportion of IL-17 than unstimulated CD4+ T cells as in the healthy volunteers ($p<0.0001$). However, the increased percentage of IL-17 expression between unstimulated and stimulated CD4+ T cells among HIV infected patients was not significantly higher than that found in the healthy volunteers (0.67 VS 0.43 , $p=0.288$). There is no independent parameter related to IL-17 expression in unstimulated and stimulated CD4+ T cells in both HIV infected individuals and healthy volunteers.

The percentages of IL-17 expressed CD4+ T cells either unstimulated or stimulated with PMA/Ionomycin among HIV infected hosts were significantly higher than those of the healthy volunteers. The findings suggest that polyclonal T cells activation is common among patients with chronic asymptomatic HIV infection. IL-17 may be one of proinflammatory cytokines to indicate the activation state of immunity.

Department Medicine Student's signature.....
Field of study Medicine Advisor's signature.....
Academic year 2004 Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม ที่คอยให้คำชี้แนะและปรับปรุงแก้ไขระเบียบวิจัย ติดตามและช่วยเหลือทั้งในด้านองค์ความรู้และขอเงินทุนวิจัย งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ผศ.นพ. เจตชนง แก้วสงครามที่แนะนำตรวจแก้ไขเนื้อหาของวิทยานิพนธ์ให้สื่อความหมายได้ตรงตามวัตถุประสงค์และมุมมองที่ถูกต้องในเชิงวิทยาศาสตร์ด้านภูมิคุ้มกันวิทยา คุณสุปราณี บุรณประดิษฐ์กุล ผู้เป็นที่ปรึกษา สอนเทคนิควิธีตรวจทางห้องปฏิบัติการ เตรียมแผนงานทางห้องปฏิบัติการ ประสานงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการและการใช้ห้องปฏิบัติการ ทั้งสามท่านถือเป็นต้นแบบที่ดีของการเป็นนักวิจัยที่ทุ่มเท อดทนและมีความเชี่ยวชาญชำนาญงานในด้านที่ตนกำลังศึกษาวิจัยอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ในสาขาวิชาโรคภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันทางคลินิกและห้องปฏิบัติการ Vaccine and Cellular Immunology Lab ทุกท่านที่คอยเป็นกำลังใจและช่วยเก็บตัวอย่างเลือดและข้อมูลของอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการนี้

ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อนุมัติทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช (Pilot Project) สำหรับโครงการวิจัยนี้ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ประพันธ์ ภาณุภาค และเจ้าหน้าที่คลินิกนิรนาม ศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย ที่ให้โอกาสเข้าไปพูดคุยกับอาสาสมัครที่ติดเชื้อเอชไอวีและเก็บตัวอย่างเลือดมาใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ และช่วยเหลือประสานงานในการเก็บข้อมูลอาสาสมัครที่ติดเชื้อเอดส์ งานวิจัยนี้สำเร็จได้ตามเป้าหมาย

ขอขอบคุณ แพทย์หญิงรัชณี โอเจริญ ผู้อำนวยการศูนย์บริจาคโลหิต สภากาชาดไทย แพทย์หญิงทัศนีย์ สกุดคำรงพานิช และเจ้าหน้าที่เจาะเลือดที่สภากาชาดไทยที่ให้โอกาสเข้าไปพูดคุยกับอาสาสมัครที่บริจาคเลือด เชิญชวนเข้าร่วมโครงการ และขอเก็บตัวอย่างเลือดมาใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ บิดามารดา ครูอาจารย์ของข้าพเจ้าทุกคน ที่ปลูกฝังความรู้ และเจตคติความรับผิดชอบในการทำงานของข้าพเจ้าจนสามารถทำงานวิจัยนี้ได้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านอย่างสูงที่บริจาคเลือดสำหรับการเตรียมงานทางห้องปฏิบัติการในระยะแรก และเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจและเต็มใจเสียสละช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย	2
1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	3
1.5 รูปแบบการวิจัย	3
1.6 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.7 การดำเนินการวิจัยโดยย่อ	3
1.8 วิธีวิเคราะห์ผล	4
1.9 คำสำคัญ (Keyword)	4
1.10 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	5
2. Interleukin 17 (IL-17)	6
2.1 การค้นพบ Interleukin 17 (IL-17).....	6
2.2 IL-17 Cytokine Family และเซลล์ที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.3 กลไกการกระตุ้นการสร้าง IL-17.....	12
2.4 หน้าที่และบทบาทของ IL-17... ..	10
2.5 ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจากการติดเชื้อเอชไอวีและบทบาทของ IL-17 ในด้าน ภูมิคุ้มกัน.....	16

	หน้า
3. เทคนิคการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ (Intracellular Cytokine Staining).....	19
3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็น.....	21
3.2 ขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์ในหลอดทดลอง.....	21
3.3 ขั้นตอนการ Fixation และการเจาะรู Permeabilization ของเยื่อหุ้มเซลล์.....	23
3.4 การย้อม surface markers บนผิวเซลล์ที่ถูกกระตุ้น.....	25
3.5 การย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์.....	26
3.6 การนับเซลล์และสัดส่วนที่ติดสีย้อมไซโตไคน์ด้วย Flow Cytometry.....	27
4. วัสดุและวิธีการ.....	29
4.1 ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample).....	29
4.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	30
4.3 วิธีการ หรือ สิ่งแทรกแซง (Intervention).....	42
4.4 การรวบรวมข้อมูล.....	43
4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
4.6 ปัญหาทางจริยธรรม.....	44
5. ผลการวิจัย.....	38
6. อภิปรายผลการวิจัย.....	71
6.1 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรตัวอย่าง.....	71
6.2 ผลการทดสอบ IL-17 expressin โดยวิธีย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ และ Flow Cytometry.....	72
6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองในการ Expression ของ IL-17 ภายในเซลล์ CD4+ T cells.....	77
7. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	69
7.1 สรุปผลการวิจัย.....	79
7.2 ข้อเสนอแนะ.....	80
รายการอ้างอิง.....	80
ภาคผนวก.....	94
ก. ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent Form).....	95
ข. แบบสอบถาม.....	100
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	108

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดง สมาชิกของ IL-17 Family แหล่งที่ตรวจพบและหน้าที่โดยสังเขป	9
2. สรุปลักษณะวิธีการตรวจหาไซโตไคน์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ	20
3. แสดงข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้าร่วมการศึกษา	46
4. แสดงความถี่ของระยะเวลาการติดเชื้อและการรักษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	47
5. แสดงค่าเฉลี่ยและค่ามัธยฐานของ Cytokine Expression ภายใน CD4+ T cells ทั้งที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย Mitogens ของอาสาสมัครในแต่ละกลุ่ม	57
6. แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์ T Helper Cells ที่มี IL-17 Expression หรือ IFN-gamma Expression ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	57
7. แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์ CD4+ T cells ที่แสดง IL-17 Expression หรือ IFN-gamma Expression ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยไมโทเจนในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	58
8. แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของ % expression ของ IL-17 และ IFN- γ ภายในเซลล์ CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ของอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี และวิเคราะห์ความแตกต่างของทั้งสองกลุ่ม.....	58
9. แสดงการเปรียบเทียบร้อยละของ IL-17 Expression หรือ IFN- γ Expression ภายในเซลล์ CD3+CD4- T cells ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี...	61
10. แสดงการเปรียบเทียบร้อยละของ IL-17 Expression หรือ IFN- γ Expression ภายใน CD3+CD4- cells ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยไมโทเจน ในอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	62
11. แสดงปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องในการพิจารณาความสัมพันธ์กับ IL-17 Expression ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	63
12. แสดงปัจจัยทางกายภาพของคนที่ไข้และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องในการพิจารณาความสัมพันธ์กับ IL-17 Expression ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี.....	64
13. แสดงผลลัพธ์จากการวิเคราะห์การถดถอยเพื่อหาตัวแปรอิสระที่สามารถเป็นปัจจัยกำหนด IL-17 Expression หลังกระตุ้น CD4+ T Cells ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	65

ตารางที่	หน้า
14. แสดงผลลัพท์จากการวิเคราะห์การถดถอยเพื่อหาตัวแปรอิสระที่สามารถเป็นปัจจัยกำหนด IL-17 Expression หลังกระตุ้น CD+ T Cells ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี	66
15. แสดงความสัมพันธ์และกระจายตัวของจำนวนอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี เมื่อพิจารณา CD4+ cell count และ IL-17 Expression ในเซลล์ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin.....	68
16. แสดงลักษณะของกลุ่มประชากรตัวอย่างที่มีภาวะ Eosinophilia ทั้งอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	70



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	รูปแสดงแบบจำลองหน้าที่และบทบาทของ IL-17 ในบริเวณที่มีการอักเสบซึ่งเกี่ยวข้องกับ IL-17A, IL-17E และ IL-17F	10
2.	รูปแสดง Cellular Signaling of IL-17 Cytokines	12
3.	รูปแสดง IL-17 Pathway เซลล์และ Cytokines อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง	15
4.	รูปแสดง Effects of IL-17 on Cell Populations	15
5.	รูปแสดงขั้นตอนการซ่อมแซมไซโตไคน์ภายในเซลล์โดยสรุป	24
6.	รูปแสดงสัดส่วนการ Expression ของ IL-4 และ IL-5 ภายในเซลล์จากการนับเซลล์ด้วยเทคนิค Flow Cytometry	25
7.	รูปแสดง Scatter Diagram ของ Flow Cytometry เพื่อนับเซลล์ชนิด CD4 บนผิวเซลล์ (CD4+T cells)	32
8.	รูปแสดง Scatter Diagram ของ IL-17 Expression ในเซลล์ CD4+ T cells ต่อการตอบสนองด้วยแอนติเจนชนิดต่าง ๆ	36
9.	รูปแสดง Scatter Diagram ของ IL-17 Expression หลังกระตุ้นด้วย PMA/I หรือ PPD/TT เทียบกับไม่ผ่านการกระตุ้น (Negative Control)	37
10.	รูปแสดงตัวอย่างการเกิด Downregulation ของ CD4 Surface Marker เมื่อกระตุ้นด้วย Mitogen	38
11.	รูปแสดงการเกิดปรากฏการณ์เซลล์รวมกลุ่ม (CD4 Downregulation) และเซลล์ตายเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย PMA/I นานถึง 24 ชั่วโมง.....	41
12.	รูปแสดงตัวอย่าง Scatter Diagram ของ PBMC ในอาสาสมัครสุขภาพดี.....	50
13.	รูปแสดงตัวอย่าง Scatter Diagram ของ PBMC ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	51
14.	รูปแสดง Scatter Diagram ของ IL-17 Expression ก่อนและหลังกระตุ้น.....	52
15.	รูปแสดงตัวอย่าง Scatter Diagram ของ CD3+ CD4+ T Cells หลังกระตุ้น ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งมี expression ของทั้ง IFN-gamma และ/หรือ IL-17 และ expression ทั้ง IL-4 และ/หรือ IL-17.....	53
16.	รูปแสดง Scatter Diagram ของค่า % IL-17 Expression ของอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละราย.....	54

รูปที่		หน้า
17.	แผนภูมิรูปแท่งแสดงการเปรียบเทียบค่ามัธยฐานของ % Expression ของไซโตไคน์ ก่อนและหลังกระตุ้นด้วย Mitogens ในคนไข้แต่ละกลุ่ม.....	54
18.	กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของ IL-17 Expression ในเซลล์ CD4+ T Cells ที่ไม่ได้ ถูกและถูกกระตุ้นด้วย Mitogens ในผู้ติดเชื้อเอดส์.....	55
19.	กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของ IL-17 Expression ในเซลล์ CD4+ T Cells ที่ไม่ได้ ถูกและถูกกระตุ้นด้วย Mitogens ในอาสาสมัครสุขภาพดี.....	56
20.	แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของสัดส่วน IL-17 expression ในเซลล์ CD4+ T cells ที่มี expression มากกว่าค่า cutpoint ในกลุ่มที่ไม่ถูกและถูกกระตุ้นด้วย PMA/onomycin จากกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี.....	60



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Ab	Antibody
AP-1	Activator protein-1 เป็นชนิดหนึ่งใน Activating transcription factors
APC	Allophycocyanin เป็นหนึ่งใน fluorochromes ที่ให้สีฟ้า
ENA-78	Epidermal cell-derived neutrophil chemotactic activator หรือ CXCL5 ถือเป็นชนิดหนึ่งใน ELR type (Glu-Leu-Arg motif) CXC chemokines
FITC	Fluorescein isothiocyanate เป็นหนึ่งในสี fluorochromes ที่ให้สีเขียว
GCP-2	Granulocyte chemotactic protein 2 หรือ CXCL-6
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor ทำหน้าที่เพิ่มจำนวนเซลล์นิวโทรฟิลและโมโนไซต์รวมทั้งไปถึงแมคโครฟาจและ dendritic cells อื่นด้วย
GRO- α	Growth factor-related oncogene alpha หรือ CXCL-1
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin -6
IL-8	Interleukin -8
IL-10	Interleukin-10
IL-15	Interleukin -15
IL-17	Interleukin -17
IL-23	Interleukin -23
IFN- γ	Interferon-gamma
Per CP	Peridin-chlorophyll-a-protein เป็นหนึ่งในสี fluorochromes ที่ให้สีแดง
PE	Phycoerythrin เป็นหนึ่งในสี fluorochromes ที่ให้สีส้ม
PGE2	Prostaglandin E2
TCR	T cell receptor
Th0	T helper cell, undifferentiated type
Th1	T helper cells type 1

Th2

T helper cells type 2

TNF- α

Tumor necrotic factor-alpha



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เชื้อเอชไอวีสามารถทำลายภูมิคุ้มกันได้โดยตรงเนื่องจากเซลล์เป้าหมายสำคัญคือเซลล์น้ำเหลืองชนิด CD4+ T cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (Cell Mediated Immunity) ภาวะภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์บกพร่องในผู้ติดเชื้อเอชไอวีจึงถือเป็นพยาธิกำเนิดที่สำคัญ และสามารถนำไปอธิบายความชุกของการติดเชื้อฉวยโอกาสทั้งแบคทีเรียในเซลล์ ไวรัส เชื้อรา และมะเร็งที่เพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยเอชไอวีได้อย่างไรก็ตามด้วยข้อมูลความชุกของการติดเชื้อแบคทีเรียนอกเซลล์บางชนิดที่เพิ่มสูงขึ้น เช่น เชื้อนิวโมคอคคัส (1-3) ร่วมกับการตรวจพบความผิดปกติจากหน้าที่การตอบสนองของนิวโทรฟิลต่อเชื้อแบคทีเรียในผู้ติดเชื้อเอชไอวีโดยที่จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดนี้จะอยู่ในเกณฑ์ปกติก็ตาม (4-6) จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อเอชไอวีสามารถรบกวน ทำลายการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันน้ำเหลืองและเซลล์ในระบบการอักเสบต่างๆ ได้เช่นเดียวกับที่พบในการติดเชื้อหัด (7-9) ความสัมพันธ์ดังกล่าวน่าจะเกี่ยวเนื่องจากหน้าที่ของเซลล์ CD4+ T cells ในด้านการประสานงานช่วยเหลือในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี สมมุติฐานนี้จึงสอดคล้องกับมาตรฐานการดูแลผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่แนะนำให้วัคซีนป้องกันเชื้อนิวโมคอคคัสแก่ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีระดับเม็ดเลือดขาว CD4+ T cells น้อยกว่า 200 ตัวต่อซีซี (10) ปรากฏการณ์ดังกล่าวถือเป็นตัวอย่างที่ดีในการอธิบายความซับซ้อน สอดประสานและควบคุมซึ่งกันและกันของ เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์น้ำเหลือง และสารภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันในการป้องกันตัวและทำลายเชื้อโรค

IL-17 เป็นไซโตไคน์ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่สร้างจาก CD4+ T cells ที่ถูกกระตุ้นและเซลล์ความจำชนิด CD4+ T cells ข้อมูลปัจจุบันยังพบว่ามีเซลล์อื่น เช่น eosinophils, neutrophils, bronchial epithelial cells, fibroblasts และ CD8+ T cells สามารถหลั่งสารนี้ได้เช่นกัน(11-12) แม้ว่าการศึกษาที่ผ่านมาแสดงข้อมูลที่ขัดแย้งกันว่า CD4+ T helper cells ที่สร้างสาร IL-17 อาจเป็นได้ 3 subsets โดยบางรายงานพบว่าเป็น Th1 (13) หรือ Th2 (14) หรือ Th0 (13,15) แต่ปัจจุบันพบว่า IL-17 เป็นกลุ่มไซโตไคน์ที่มีสมาชิกอยู่อย่างน้อย 6 ชนิดได้แก่ IL-17A ถึง IL-17F ซึ่งมีเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในแต่ละชนิดแตกต่างกัน การศึกษาบทบาทของ IL-17 ในโรคต่าง ๆ พบว่า IL-17 มีระดับสูงขึ้นในกลุ่มโรคข้อจากภาวะภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง (immune mediated arthritis) ภาวะสตีคอวียะปลูกถ่ายใน kidney

transplants โรคหืดและยังพบว่าเป็นสารที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนและพัฒนาเซลล์นิวโทรฟิลให้เจริญเต็มวัยทำหน้าที่ได้อย่างเต็มที่ จึงน่าจะเป็นไซโตไคน์สำคัญที่ใช้ในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ T cells เพื่อกระตุ้นการแบ่งตัวและการทำงานของนิวโทรฟิลผ่านไซโตไคน์และเซลล์ไฟโบบลาส อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการศึกษา IL-17 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ความเปลี่ยนแปลงของสารชนิดนี้จึงน่าจะนำมาใช้อธิบายความสัมพันธ์ของ T cells และระบบภูมิคุ้มกันที่มีแต่กำเนิด (innate immunity) รวมถึงพยาธิวิทยาของภาวะพร่องการทำงานของนิวโทรฟิลในผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้ ความสำคัญของ IL-17 ที่สัมพันธ์กับภาวะพร่องการทำงานของนิวโทรฟิลจึงอาจนำมาใช้ในการดูแลป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียและราบางชนิดในผู้ป่วยเอชไอวีในอนาคต การศึกษานี้สนใจ IL-17A ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่สร้างจาก CD4+ T cells เป็นหลัก และเลือกวิธีตรวจที่จำเพาะในการวัด IL-17 ที่สร้างมาจาก CD4+ T cells เป็นสำคัญเพื่อลดปัญหาจากตัวกวนในการแปลผลการศึกษา โดยเปรียบเทียบทั้งก่อนและหลังกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

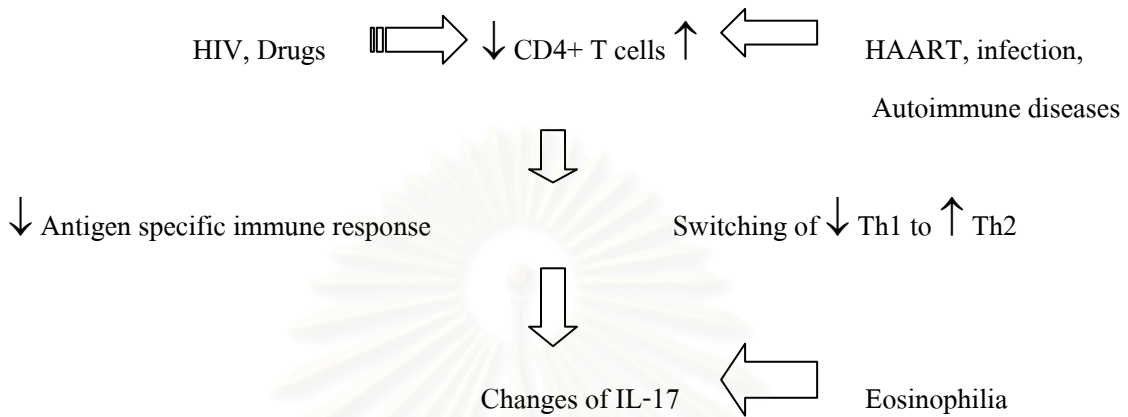
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T cells ที่สร้าง IL-17 ก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ต่อ peripheral blood mononuclear cells จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี
- 2) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของระดับการสร้าง IL-17 ของ CD4+ T cells หลังได้รับการกระตุ้นในผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีระดับเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T cells แตกต่างกัน

1.3 สมมติฐานการวิจัย

การสร้างสาร IL-17 ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4 หลังการกระตุ้นในผู้ติดเชื้อเอชไอวี น่าจะมีความแตกต่างจากกลุ่มประชากรปกติ เนื่องจากพยาธิกำเนิดของการติดเชื้อเอชไอวีจะทำให้ระดับเม็ดเลือดขาวดังกล่าวในกลุ่ม Th1 มีปริมาณลดลงจึงคาดว่าน่าจะพบการเปลี่ยนแปลงในกลุ่มผู้ติดเชื้อในสัดส่วนที่น้อยกว่ากลุ่มประชากรปกติ และการเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์นี้ น่าจะแสดงความสัมพันธ์กับระดับ CD4+ T cells ที่ลดลงในผู้ติดเชื้อเอชไอวีระยะต่าง ๆ ด้วย โดยคาดว่าสัดส่วนของระดับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T cells กับระดับการสร้าง IL-17 น่าจะมีความสัมพันธ์สอดคล้องและแปรตามกัน

1.4 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



1.5 รูปแบบการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาหนึ่ง (แบบตัดขวาง) (Cross-sectional Descriptive Studies) โดยอาศัยการวิเคราะห์ผลจากข้อมูลและการตรวจทางห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมในการศึกษา

1.6 ขอบเขตของการวิจัย

ประชากรเป้าหมาย ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีอาการหรือการติดเชื้อเรื้อรัง และประชากรสุขภาพดีทั่วไปที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

ประชากรตัวอย่าง ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มารับการรักษาที่หอผู้ป่วยนอกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และคลินิกนิรนาม สภากาชาดไทย และผู้บริจาคเลือดที่สภากาชาดไทยซึ่งมีสุขภาพดีจำนวนทั้งสิ้น 80 คน

1.7 การดำเนินการวิจัยโดยย่อ

อาสาสมัครจำนวน 80 คนได้รับการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการกลุ่มละ 40 คนโดยให้คำปรึกษาและอธิบายรายละเอียดของโครงการ ความเสี่ยง ประโยชน์ในการเข้าร่วมโครงการ เมื่ออาสาสมัครสมัครใจยินดีเข้าโครงการต้องลงนามในหนังสือยินยอมเข้าร่วมโครงการ หลังจากนั้น

แพทย์จะทำการซักประวัติและตรวจร่างกาย โดยบันทึกข้อมูลทั่วไปและข้อมูลความเจ็บป่วยแบบสอบถามและผลการตรวจร่างกายไว้ในแบบบันทึก และเจาะเลือดประมาณไม่เกิน 30 ซีซี เพื่อนำไปปั่นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์หรือ Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) หลังจากนั้นนำไปกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ย้อมด้วย monoclonal antibody สำหรับ IL-17, IFN- γ และ cell markers (CD3, CD4) แล้วนำไปนับเซลล์ที่สร้าง IL-17 ด้วยเครื่อง Flow Cytometer แล้วจึงรายงานผลเป็นร้อยละของเซลล์ CD4+ T cells ที่สร้าง IL-17 เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป นอกจากนี้เลือดที่ได้นำส่งตรวจเพิ่มเติมแล้วในแต่ละกลุ่มยังได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการอื่นดังต่อไปนี้

1. กลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี : CBC, plt count, ESR, FPG, Cr, SGOT, SGPT, AP, TB, Stool exam, UA, CXR, CD4+/CD8+ T cells, VL (viral load)
2. กลุ่ม negative control : CBC, plt count, ESR, FPG, Cr, SGOT, SGPT, AP, TB, Stool exam, UA, CXR, anti- HIV, CD4+/CD8+ T cells

1.8 วิเคราะห์ผล

หาร้อยละของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด CD4+ T cells ที่สร้าง IL-17 ก่อนและตอบสนองหลังการกระตุ้นเซลล์เปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีระดับเซลล์ CD4+ T cells แตกต่างกันและกลุ่มประชากรปกติ และดูความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงร้อยละของ IL-17 expression และจำนวนเซลล์ CD4+ T cells นอกจากนี้พิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงร้อยละของ IL-17 expression จากข้อมูลทั่วไป ข้อมูลการติดเชื้อ และผลทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ

1.9 คำสำคัญ (Keyword)

IL-17

T helper cells

HIV

AIDS

1.10 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

- 1) เพื่อให้ได้ข้อมูลของ IL-17 ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ยังไม่มีการศึกษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวีในระดับสากลและในกลุ่มประชากรไทยทั่วไปมาก่อน
- 2) เพื่อนำไปใช้อธิบายความสัมพันธ์และความเกี่ยวข้องของระบบภูมิคุ้มกันในแง่พยาธิกำเนิดของภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจากการติดเชื้อเอชไอวี
- 3) เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาและภูมิแพ้ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

Interleukin 17 (IL-17)

เซลล์ในร่างกายสามารถสื่อสารประสานงานกันได้โดยการสร้างและหลั่งโปรตีนหลายหลากชนิดเพื่อกระตุ้น หรือยับยั้ง และควบคุมเซลล์อื่น ไซโตไคน์เป็นกลุ่มโปรตีนที่สร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและในระบบอื่น ๆ เพื่อต่อสู้กับเชื้อโรคและตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมทั้งจากภายในและภายนอกร่างกาย นอกจากนี้ยังมีผลต่อกระบวนการเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์น้ำเหลืองเพื่อให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อินเตอร์ลิวคิน (Interleukin) เดิมหมายถึงไซโตไคน์ที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเซลล์น้ำเหลืองที่มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเซลล์น้ำเหลืองอื่น แต่เนื่องจากคุณสมบัติของไซโตไคน์ที่มีผลต่อเซลล์หลายชนิดในลักษณะต่าง ๆ (pleiotropic) และไซโตไคน์หลายชนิดอาจมีผลต่อเซลล์เดียวกันในลักษณะเดียวกันหรือซ้ำซ้อนกัน (redundant) ทำให้ปัจจุบันพบว่า interleukin หลายชนิดสามารถมีผลต่อเซลล์หลายชนิดได้โดยไม่จำกัดอยู่เฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเซลล์น้ำเหลืองเท่านั้น

2.1 การค้นพบ Interleukin 17 (IL-17)

Interleukin 17 (IL-17) จัดเป็นกลุ่มไซโตไคน์ (cytokine family) ใหม่ที่สมาชิกในกลุ่มเริ่มเป็นที่สนใจเมื่อ 2-3 ปีที่ผ่านมา (16-17) แม้ว่า IL-17A ถูกค้นพบเป็นชนิดแรกตั้งแต่ พ.ศ. 2538 (16) IL-17 ถือเป็น proinflammatory cytokine ชนิดหนึ่ง และปัจจุบันมีข้อมูลว่าส่วนใหญ่สร้างจากเซลล์ CD4⁺ T cells ที่ได้รับการกระตุ้นเท่านั้น โดยจะไม่พบสารนี้ในเซลล์ที่อยู่ในภาวะ resting state ในปี พ.ศ. 2536 Rouvier และคณะ (18) พยายามแยกคัดกรองยีนต่าง ๆ ใน T cell hybridoma ซึ่งสร้างจากหนู (fusion ของ mouse cytotoxic T cells และ rat T cell lymphoma) และสามารถตรวจพบสารนี้เป็นครั้งแรก ซึ่งในตอนนั้นเชื่อว่าน่าจะเป็นสารที่แยกมาจาก activated murine cytotoxic T cells ในหนูจึงตั้งชื่อเป็น CTLA-8 (cytotoxic T cell lymphocyte-associated antigen-8) อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบพบว่าสารนี้มีลักษณะแตกต่างจาก CTLA series อื่นอย่างมากจึงสมควรเปลี่ยนชื่อใหม่เป็นสาร IL-17 ต่อมา Kennedy และคณะ (19) รายงานว่าสาร IL-17 homolog ในหนู rat เป็นสารประกอบไกลโคโปรตีน มีขนาดประมาณ 21 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโน (aa) 150-157 ตัว แยกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ signal sequence และ mature residues ซึ่งมีจำนวน aa ประมาณ 137 ตัว นอกจากนี้ยังมีการเรียงตัวเหมือนโปรตีนที่สร้างจากยีนลำดับที่ 13 ของเชื้อ *Herpesvirus saimiri* (HVS 13 หรือ vIL-17) ถึง

ร้อยละ 57 (20) และพบว่า IL-17 เป็นส่วนหนึ่งของ ligand-receptor system ที่มีบทบาทควบคุมการสร้าง cytokines ต่าง ๆ อีกหลายชนิด (21) ซึ่งจะได้กล่าวในลำดับต่อไป

เมื่อ Yao และคณะ (16) สามารถแยกยีนที่สร้าง IL-17 ได้ทำให้ทราบว่ายีน IL-17 ของมนุษย์นั้นอยู่บนโครโมโซมที่ 2q31 อย่างไรก็ตามยังพบว่าเรียงตัวบน clone ของโครโมโซมที่ 6p12 ด้วย (12) IL-17 เป็นสาร glycosylated polypeptide ที่มีขนาด 20-30 kDa ลักษณะเป็น homodimer ประกอบด้วยกรดอะมิโน 155 ตัวที่แสดงการเรียงตัวคล้ายกับ IL-17 ในหนูถึงร้อยละ 58- 63 ขึ้นกับชนิดของหนูที่นำมาศึกษา สารโปรตีนนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนเหมือนที่กล่าวมาแล้วในหนู ได้แก่ signal sequence 19 aa และ residual mature segment 136 aa ซึ่งภายในมี cysteine residues 6 สาย และอย่างน้อย 1 N-linked glycosylation site สำหรับการเรียงตัวของกรดอะมิโนของ IL-17 นั้นยังพบว่ามีลักษณะเหมือนกับในส่วน ORF-13 (open reading frame) ของเชื้อ Herpesvirus saimiri (HVS) มากถึงร้อยละ 72 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไวรัสสามารถดัดยีน IL-17 เก็บไว้ในช่วงวิวัฒนาการเพื่อเป็นข้อดีสำหรับการอยู่รอดเมื่อมีการติดเชื้อในธรรมชาติ (16) นอกจากนี้เมื่อพิจารณา mRNA ที่สร้าง cytokine นี้ในมนุษย์และหนูยังพบว่า มีส่วน ATTTA motifs เหมือนกัน (17-18) ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบใน proinflammatory cytokines ชนิดอื่นได้เช่นกัน ส่วน motif นี้ยังมีผลช่วยลดการตอบสนองของ IL-17 จากการกระตุ้นโดยเชื้อโรคในระยะยาวด้วย (22)

จวบจนถึงปัจจุบันยังไม่พบว่ามี cytokine ชนิดอื่นที่มีโครงสร้างการเรียงตัวเหมือน IL-17 แต่อย่างใด (17, 23) และยังไม่พบว่ามี IL-17 receptor (IL-17R) มีลักษณะที่สัมพันธ์กับ receptor ของไซโตไคน์ตัวอื่น ๆ หรือมีส่วน recognizable domains ที่คล้ายกับไซโตไคน์ตัวอื่นด้วย (23) ดังนั้น IL-17 จึงเป็นไซโตไคน์ที่มีลักษณะจำเพาะและมีระบบ ligand-receptor signaling system ของตัวเองที่แตกต่างกับไซโตไคน์ตัวอื่น

2.2 IL-17 Cytokine Family และเซลล์ที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันมีการค้นพบสมาชิกในกลุ่มไซโตไคน์ IL-17 นี้ถึง 6 ชนิด โดยอาศัยความรู้ในด้าน human genome sequences ซึ่งมีความก้าวหน้าขึ้นตามลำดับ โดยเรียกชื่อต่อท้ายเป็นอักษรภาษาอังกฤษ ตั้งแต่ A-F ไซโตไคน์ในกลุ่มนี้มี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 ถึง 30 kd และลักษณะไม่เหมือนกัน เนื่องจากมีแหล่งตรวจพบจากเซลล์ในร่างกายแตกต่างกันจึงคาดว่าแต่ละชนิดอาจจะมีหน้าที่แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามการเรียงตัวของกรดอะมิโนในโครงสร้างของไซโตไคน์ IL-17A มีความเหมือนกับ IL-17F ถึงร้อยละ 50 ขณะที่ IL-17A คล้ายกับสมาชิกตัวอื่นเพียงร้อยละ 10 ถึง 30

จากการศึกษาพบว่า IL-17A สร้างมาจากเซลล์ activated CD4+ T cells (CD3+/CD4+/CD8-) เป็นหลัก (16, 23-24) ซึ่งสามารถตรวจพบ IL-17mRNA ในเซลล์ memory CD4+ T cells หรือ CD4+/CD45RO+ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี cytometric single-cell analysis ในกลุ่มเซลล์ Th cells ยังพบว่า Helper T cells (Th) ที่สามารถสร้าง IL-17 ได้มีลักษณะต่างจาก classical Th1 และ Th2 cells และผลจาก Northern analysis แสดงให้เห็นว่ากลุ่มเซลล์ที่มี IL-17 expression อย่างมีนัยสำคัญได้แก่ $\alpha\beta$ TCR+CD4-CD8- ซึ่งสามารถสร้างและ co-express TNF- α และ GM-CSF ได้ด้วย (19) เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการตรวจที่ไม่พบการสร้างไซโตไคน์จำเพาะของกลุ่มเซลล์ตัวอื่นซึ่งสัมพันธ์กับ ชนิดของ Th cells เช่น IL-4 หรือ IFN- γ มี expression สูงขึ้นในเซลล์ที่สร้าง IL-17 จึงทำให้ไม่สามารถ จัดเซลล์ที่สร้าง IL-17A ให้อยู่ในกลุ่มของ Th1 หรือ Th2 ได้ (13, 24-25) นอกจากนี้ยังพบรายงานว่า เซลล์ neutrophils (26), eosinophils (27) และ CD8+ T cells (28) สามารถสร้าง IL-17 ได้เช่นกัน สำหรับแหล่งที่ตรวจพบไซโตไคน์ชนิดอื่นใน IL-17 family ได้สรุปไว้ในตารางที่ 1

IL-17A, -E, -F เป็นไซโตไคน์ใน family ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ สร้างจากเซลล์ อักเสบที่ถูกกระตุ้นอันได้แก่ CD4+T cells และ แมคโครฟาจ (IL-17E, -F expression) ถึงแม้ว่า T cells เป็นเซลล์หลักที่สร้าง IL-17A, IL-17E และ IL-17F แต่ยังมีปัญหาที่ต้องการคำตอบอีกมาก เช่น เซลล์ ในกลุ่ม (Clone) เดียวกันสามารถสร้างหรือมี co-express ทั้ง IL-17A และ IL-17F และ/หรือ IL-17E ได้ หรือไม่ ลักษณะของ antigens ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-17 ได้อย่างดีควรเป็นอะไร แม้ว่าปัจจุบัน จะทราบว่าถ้ากระตุ้นร่วมกับเซลล์ dendritic cells ซึ่งทำหน้าที่เป็น antigen presenting cells จะทำให้ เซลล์ CD4+ T cells สามารถ express IL-17 ได้ดีขึ้น นอกจากนี้พบด้วยว่านอกจากแอนติเจนแล้ว ไซโตไคน์ 2 ตัวได้แก่ IL-15 (26) และ IL-23 (29-31) ยังเป็นตัวกระตุ้น IL-17A ที่สำคัญ เนื่องจากทั้ง 2 ตัวเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาไปเป็น memory T cells สำหรับ IL-23 ยังเกี่ยวข้องกับกลไกใน innate immunity และการตอบสนองของ mucosal T cell ด้วย ดังนั้น IL-17A จึงเป็น effector cytokine ซึ่งอาจมีบทบาทในการเชื่อมต่อประสานงานระหว่าง innate และ adaptive immunity (11)

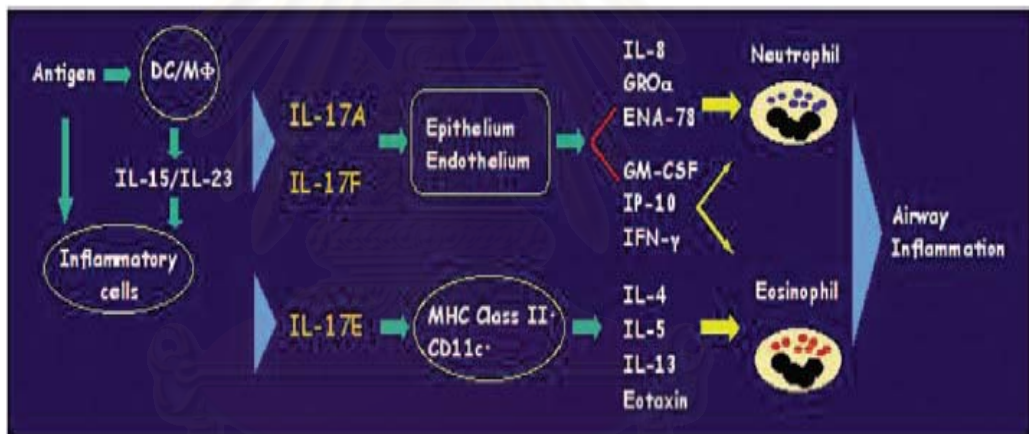
ตารางที่ 1 แสดง สมาชิกของ IL-17 family แหล่งที่ตรวจพบและหน้าที่โดยสังเขป

IL-17 members	Expressing cells	Homology	Sources	Effects	References
IL-17A	Activated CD4+ T cells (PMNs, Eosinophils, CD8+ T cells)	50% IL-17F	Lung, Inflammatory joints	PMN activation and recruitment	32-34
				AHR	35-36
IL-17B	Not identified	IL-17D	Spinal cord, Pancreas, Small intestine, Stomach, Brain, Ovary	Innate immunity via TNF- α , IL-1B induction	37-38
IL-17C	Not identified	10%IL-17A	Adult prostate and fetal kidney libraries	as IL-17B	37-38
IL-17D	CD4+ T cells, CD19+ B cells	IL-17B	Muscles, Brain, Fat Lung, Pancreas	Stimulation of IL-6, IL-8, GM-CSF production	39
IL-17E (IL-25)	CD4+ Th2 cells	30%IL-17A	Kidney, Lung, Testis, Prostate, CNS, Adrenal gland	Th2 induction	40-41
				Eosinophil recruitment	40-42
IL-17F	Activated CD4+Tcells, Cord-blood mast cells, Activated basophils	50%IL-17A	Liver, Lung, Ovary Almost all tissues	PMN activation and recruitment	43-45
				AHR	45

AHR: Airway hyperresponsiveness

จากตารางจะเห็นว่า IL-17B และ IL-17C ไม่สามารถกระตุ้นให้ fibroblasts สร้าง IL-6 ได้เหมือน IL-17A แต่ยังสามารถกระตุ้นให้ THP-1 monocytic leukemia cell line สร้าง IL-1 β และ TNF- α ได้ ขณะที่ IL-17D สามารถกระตุ้นให้ endothelial cells สร้าง IL-6, IL-8 และ GM-CSF และ IL-17F สามารถกระตุ้นให้ fibroblasts สร้าง G-CSF, IL-8 และ endothelial cells สร้าง TGF β ได้ การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียจะกระตุ้นให้มี IL-17A, -F expression ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไปในทาง Th1 polarization ในขณะที่ IL-17E จะมีความแตกต่างจากกลุ่ม เนื่องจากจะก่อให้เกิด Th2 mediated reactions ทำให้มีภาวะ eosinophilia ระดับของ IgE สูงขึ้น และ IL-4, IL-5, IL-13, eotaxin expression มากขึ้นในเนื้อเยื่อบริเวณนั้น (40-42) ซึ่งแสดงให้เห็นดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 แสดงแบบจำลองหน้าที่และบทบาทของ IL-17 ในบริเวณที่มีการอักเสบซึ่งเกี่ยวข้องกับ IL-17A, IL-17E และ IL-17F (11)



Mφ : Macrophages DC: Dendritic cells

IL-17 Receptors และ Signaling Pathways ที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับ receptors ของ IL-17A และ IL-17E เท่านั้น สำหรับลักษณะจำเพาะของ IL-17 receptors (IL-17R) นั้นถูกกำหนดโดยยีนบนโครโมโซมที่ 22 (46) เป็น type I transmembrane receptor ที่มีขนาด 120 kDa ประกอบด้วยส่วน N-terminal signal peptide with cleavage site 27 aa ตามด้วยส่วนไกลโคโปรตีน 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนนอกเซลล์ (extracellular residue) 293 aa, transmembrane domain 21 aa และ ส่วนภายในไซโตพลาสซึมที่ยาวกว่าปกติ (cytoplasmic residue) 525 aa ซึ่งไม่มี conserved signaling domains เหมือนที่พบในส่วน cytoplasmic domain เช่น receptor ของไซโตไคน์อื่น IL-17R ยังประกอบด้วย N-linked glycosylation sites อย่างน้อย 7

ตำแหน่ง อย่างไรก็ตาม IL-17 receptors สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อหลายแห่งในร่างกาย (16) เช่น T cell thymoma cells, B cell line, myelomonocytic cell line, lung epithelial cell line, fetal hepatocytes, foreskin fibroblasts, mast cells, muscle cells, embryonic kidney cell line และ intestinal epithelial cells เป็นต้น นอกจากนี้ IL-17 receptor ยังมีบางส่วนที่มีลักษณะคล้าย class I cytokine receptors อื่น เช่น IL-2R β , IL-4 R และ G-CSF R

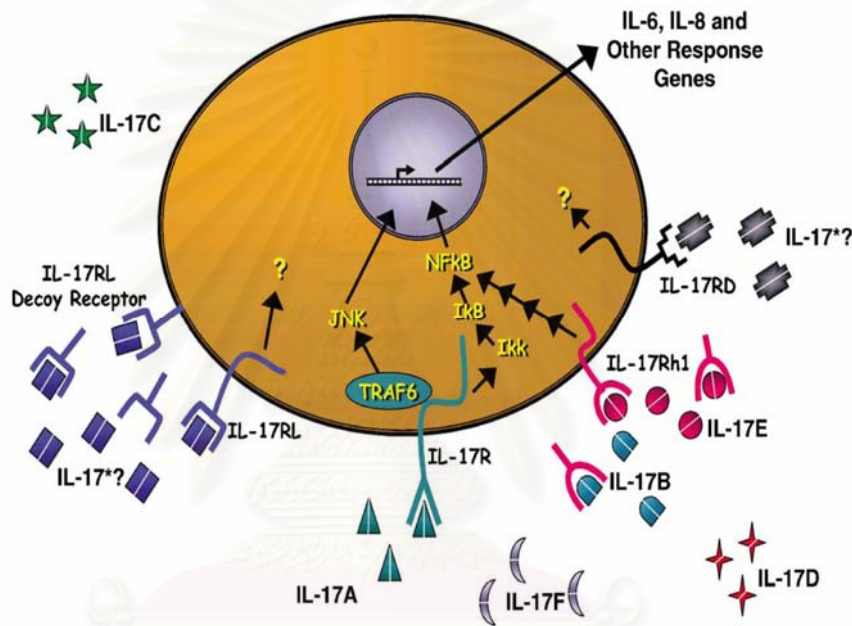
แม้ว่า IL-17R ของคนมีส่วนคล้ายกับของหนูถึงร้อยละ 69 และ affinity ของการจับกันระหว่าง IL-17 กับ receptor จะมีความแรงต่ำ (K_a ประมาณ 2×10^7 - 2×10^8 /M) แต่เพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดผลตอบสนองได้ ไซโตไคน์ใน family นี้จะมี receptor ที่จำเพาะของแต่ละชนิด และไม่สามารถแย่งจับกันได้อย่างไรก็ตามข้อมูลในขณะนี้ยังไม่ชัดเจน ต้องรอผลการศึกษาต่อไป การทดลองในหนูที่เป็น IL-17R knockout mice พบว่า IL-17R มีความสำคัญต่อการเกิด neutrophil recruitment ในระยะแรก รวมถึงการกระตุ้น G-CSF และ MIP-2 ทั้งในระดับ mRNA และการสร้างโปรตีน เนื่องจาก MIP-2 เป็น chemokine ที่จำเป็นสำหรับ diapedesis และ chemotaxis ของ neutrophils ยิ่งไปกว่านั้นหนูที่ขาด IL-17R จะมีอุบัติการณ์ของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดและอัตราการตายจากการติดเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* infection สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (47) จากข้อมูลที่ผ่านมาจึงเป็นไปได้ว่าสาร IL-17 น่าจะเป็นสัญญาณที่สำคัญในการสร้าง CXC chemokine และสามารถกระตุ้น G-CSF ซึ่งทำให้เกิดการสร้างเซลล์ neutrophil เพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อในปอดได้

IL-17 สามารถกระตุ้น expression ของไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่มีตำแหน่งจับ nuclear factor kappa B (NF- κ B) บนส่วน promoters ของไซโตไคน์นั้น ๆ และยังกระตุ้น NF- κ B transcription factors ในเซลล์ต่าง ๆ ได้เช่น fibroblasts แมคโครฟาจ chondrocytes และ intestinal epithelium เป็นต้น IL-17A จะใช้ pathways ที่ควบคุมโดย mitogen activated protein kinases (MAPKs) ทั้ง 3 ระดับคือ extracellular signal-regulated kinases (ERK-1 และ ERK-2), stress-induced c-Jun NH2-terminal kinases (JNK-1 และ JNK-2) และ p38 MAPK ซึ่งอยู่ในเซลล์หลายชนิดโดยเฉพาะเยื่อบุผิวหลอดลม (48-49) เมื่อ p38 ถูกกระตุ้นโดย IL-17 จะส่งผ่านสัญญาณทำให้มี upregulation ของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ COX-2 gene (50) ทั้ง IL-17A, -D และ -E สามารถกระตุ้นผ่าน NF κ B ได้ซึ่งจะขึ้นกับ TNF receptor-associated factor 6 (51) ขณะที่ IL-17F จะกระตุ้นผ่าน ERK 1/2 ได้โดยไม่ผ่าน p38 และ Jun NH2-terminal kinases นอกจากนี้ IL-17 ยังสามารถกระตุ้น signaling pathway of Janus kinases (JAKs) และ signal transducers and activators of transcription (STATs) ได้หลายชนิด (50) ได้แก่ Tyk2, JAK1-3 และ STAT 1-4 จะเห็นได้ว่าแม้ไซโตไคน์แต่ละตัวในกลุ่ม family จะคล้ายกันในด้านโครงสร้างโมเลกุล และสามารถกระตุ้นให้มีผลตอบสนองได้คล้ายกัน แต่เนื่องจากใช้

intracellular signaling pathways ที่แตกต่างกัน จึงทำให้ผลการทำงานอาจมีความต่างกันในรายละเอียด ดังรูปที่ 2

รูปที่ 2 แสดง Cellular signaling of IL-17 cytokines (52)

: Question mark = unknown pathways. There are no known receptors for IL-17C, IL-17D and IL-17F.
There are no known ligands for IL-17RL, IL-17RD or IL-17RE.



2.3 กลไกการกระตุ้นการสร้าง IL-17

ขณะนี้ข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการกระตุ้นและควบคุมการสร้าง IL-17 ยังมีน้อย ข้อมูลปัจจุบันพบว่าส่วน lipopeptides จากเชื้อแบคทีเรีย เช่น lipopolysaccharide จากเชื้อ E. coli (53) สามารถกระตุ้น Th cell ให้สร้าง IL-17 ได้โดยผ่าน antigen presenting cells (APC) ด้วย Toll-like receptor (TLR) pathway จากกระบวนการดังกล่าวจึงเป็นไปได้ว่า IL-6 และ IL-18 จาก activated APC อาจจะเป็นสารที่กระตุ้นให้ Th cells สร้าง IL-17 ได้ในเวลาต่อมา และพบว่าการกระตุ้น activated T cells สามารถสร้าง IL-17 ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า (24) นอกจากนี้ข้อมูลการศึกษาปอดอักเสบจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบในสัตว์ทดลอง (30) ยังพบว่าเซลล์ dendritic cells ที่ถูกกระตุ้นผ่าน TLR-4 จะหลั่ง IL-23 ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ CD4+ และ CD8+ T cells สร้าง IL-17 ตอบสนองต่อการติดเชื้อ

ดังนั้นจึงทำให้สันนิษฐานได้ว่าหากมีการยับยั้ง T cells ที่สร้าง IL-17 อาจจะสามารถลดการอักเสบเรื้อรังจากการติดเชื้อแบคทีเรียบางชนิดได้ เช่น กรณี Lyme disease, chlamydial infection เป็นต้น

ในหลอดทดลอง T cells ถูกกระตุ้นให้หลั่ง IL-17 ได้จากการกระตุ้นด้วย ionomycin และ phorbol 12-myristate 13-acetate (23), IL-15 (26) และ IL-23 (29) การสร้าง IL-17 สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่จำกัดและการออกฤทธิ์ยังต้องอาศัยการจับกับ receptor ที่จำเพาะเช่นกัน

2.4 หน้าที่และบทบาทของ IL-17

ข้อมูลส่วนใหญ่ขณะนี้มุ่งประเด็นความสนใจไปยังบทบาทของ IL-17 โดยเฉพาะ IL-17A, -E, -F ในด้าน immunoregulation เนื่องจากมีคุณสมบัติ pleiotropic activity ทำให้มีบทบาทในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งมีหน้าที่หลักเป็น chemoattractant ผ่านไซโตไคน์และคีโมไคน์ (chemokines) ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (11) IL-17A และ IL-17F มีบทบาทดั่งนิวโทรฟิลให้เข้ามายังเนื้อเยื่อบริเวณที่อักเสบโดยกระตุ้นเซลล์ endothelial และ epithelial cells ให้ express CXC chemokines ซึ่งได้แก่ IL-8, GRO- α , GCP-2 และ ENA-78 และหลั่งสารเมือกมากขึ้น ปรากฏการณ์ดังกล่าวสัมพันธ์กับ activity ของ IL-17 ที่เพิ่มมากขึ้น (11, 33) และยังกระตุ้นให้เซลล์ epithelial cells หลั่ง monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างสัมพันธ์กับขนาด dose ของ IL-17 ด้วย (54) นอกจากนี้ IL-17A, IL-17F ยังกระตุ้นเซลล์แมโครเฟจ และ dendritic cells ให้สร้าง IL-15 และ IL-23 ซึ่งมีฤทธิ์ด้านเชื้อโรค เกิดกระบวนการสร้างสารในตริกออกไซด์ และเสริมให้มีการรวมกลุ่มของนิวโทรฟิลเพิ่มมากขึ้น การอักเสบที่เกิดขึ้นยังมีผลต่อการกระตุ้นไซโตไคน์และ chemokines ที่เกี่ยวข้องอื่นเพิ่มด้วยเช่น GM-CSF, IFN- γ และ IL-10 เป็นต้น

หน้าที่ของ IL-17 ในการกระตุ้น granulopoiesis ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของ mature cells ใน granulocytic pathway ซึ่งแสดงให้เห็นได้ทั้งในหลอดทดลอง (17) และในสัตว์ทดลอง (32) การกระตุ้นจาก IL-17 บางส่วนเกิดขึ้นโดยผ่านสาร IL-6, G-CSF, GM-CSF และ the transmembrane form of stem cell factor (15) นอกจากนี้สาร IL-17 ยังสามารถกระตุ้น translocation ของ nuclear factor (NF- κ B) และ AP-1 ทำให้เกิดการสร้าง IL-1 β และ TNF- α (55-57) จากเซลล์ monocyte/macrophage ในปอดขณะที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียหรืออยู่ในภาวะปอดอักเสบได้ ในขณะที่เดียวกันไซโตไคน์เหล่านี้จะไปเสริมฤทธิ์ให้ IL-17 สามารถกระตุ้นการสร้าง CXC neutrophil specific chemokines และ GM-CSF ด้วย ในทางตรงกันข้าม IL-17 จะไปยับยั้งการสร้าง RANTES ที่ผ่านมาจากการกระตุ้นโดย TNF- α และ IFN- γ เนื่องจาก RANTES เป็น chemoattractant ที่แรงใน

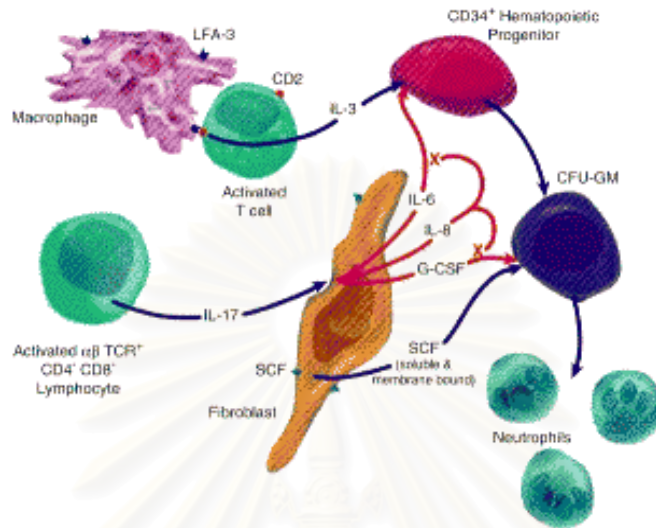
การรวมกลุ่มของเซลล์ lymphocytes (58) อย่างไรก็ตาม IL-17 ที่ปราศจากเซลล์ fibroblast หรือ epithelial cells จะไม่สามารถเกิดการรวมกลุ่มของนิวโทรฟิลในหลอดทดลองได้ (33)

IL-17 ยังมีผลต่อเซลล์ parenchymal หลายชนิดซึ่งรวมไปถึงการกระตุ้นการสร้าง IL-6, IL-8, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), leukemia inhibitory factor, PGE2, granulocyte chemotactic protein 2, monocyte chemoattractant protein (MCP) -1, การแสดง intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) และ matrix metalloproteinase expression จากเซลล์ไฟโบรบลาสรวมถึงเซลล์ stromal อื่น ๆ (22, 24, 33, 44, 59-62) เช่น การสร้าง NO, iNOS และ cyclooxygenase-2 จากเซลล์กระดูกอ่อน (63-64) การเจริญเต็มวัยของ dendritic cells (65) และการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ T lymphocyte (16) ในทางกลับกัน ยังพบว่า IL-6, IL-8 จาก activated antigen presenting cells ยังมีผลให้การสร้าง IL-17 จาก Th cell เพิ่มขึ้นได้แบบ dose dependent แม้ว่า IL-1 β , IFN- γ และ TNF- α ไม่มีผลต่อการสร้าง IL-17 (24) อย่างไรก็ตามพบว่า TNF- α และ IFN- γ จะให้ผล additive effects ในกลไกการกระตุ้น expression ของ IL-6 จาก IL-17 ได้ (17) สาร IL-17 ยังสามารถเพิ่มการแสดง TSG-6 (Tumor necrotic factor-stimulated gene-6) expression และให้ผล additive effects ร่วมกับ IL-1 β , TNF- α ต่อการแสดงของ TSG-6, IL-6 และ IL-8 ให้เพิ่มขึ้นบนผิวเซลล์ได้ จึงอาจกล่าวได้ว่า IL-17 เป็นหนึ่งในกลุ่มของ T-cell derived hematopoietic cytokines เช่นเดียวกับ IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF ซึ่งมีผลต่อกระบวนการการอักเสบ hematopoiesis และยังมีผลต่อการเจริญเต็มวัยของเซลล์ neutrophils จึงเห็นได้ว่า IL-17A ซึ่งเป็นเป้าหมายในการศึกษานี้มีหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลและระดมพลมายังแหล่งที่มีการอักเสบติดเชื้อ (activation and recruitment) ดังรูปที่ 3 ผลดังกล่าวสามารถแสดงได้จากผลการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นว่า IL-17 มีบทบาทต่อเซลล์มากมายดังสรุปไว้ในรูปที่ 4 และมีส่วนสำคัญในการก่อพยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

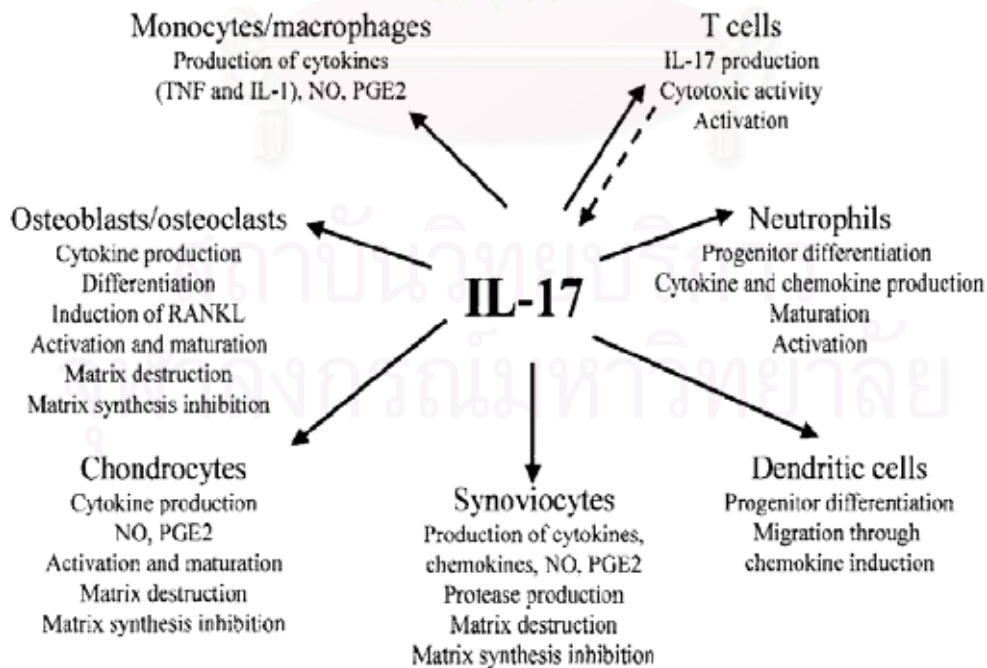
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 แสดง IL-17 Pathway เซลล์และ cytokines อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง



รูปที่ 4 แสดง Effects of IL-17 on cell populations

NO nitric oxide; PGE2 prostaglandin E2; RANKL receptor activator of nuclear factor KB ligand



2.5 ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจากการติดเชื้อเอชไอวีและบทบาทของ IL-17 ในด้านภูมิคุ้มกัน

เป็นที่ทราบกันดีว่า การติดเชื้อ HIV สามารถทำให้ระบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งเซลล์บกพร่อง เนื่องจากเซลล์เป้าหมายของเชื้อคือ CD4+ T lymphocytes แต่เนื่องจากการทำงานของภูมิคุ้มกันมีความเกี่ยวข้องประสานสัมพันธ์กันอย่างเป็นระบบ (66) จึงพบรายงานแสดงภาวะบกพร่องของภูมิคุ้มกันแบบน้ำเหลือง (humeral immunity) ในการสร้าง Opsonic antibody จากเซลล์ B cells (67) และ innate immunity เช่น monocyte, NK cells (68-69) รวมถึง neutrophil dysfunction ด้วย (4-6) ในผู้ป่วยเอดส์ด้วยเช่นกัน หน้าที่ของนิวโทรฟิลที่ผิดปกติเกิดขึ้นได้ตั้งแต่กระบวนการ adherence, chemotaxis, phagocytic, oxidative, secretory และ bactericidal activities การทำงานพร่องของนิวโทรฟิลจะส่งผลให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิด เช่น *Candida* ได้ดี แม้ว่าการกำจัดเชื้อดังกล่าวต้องอาศัยการทำงานของเซลล์โมโนไซต์ แมคโครฟาจ และนิวโทรฟิลที่อยู่ในกระแสเลือด และระบบน้ำเหลือง แต่เซลล์นิวโทรฟิลถือเป็นเซลล์หน้าด่านตัวแรกที่เข้าจัดการกับเชื้อโรคได้อย่างรวดเร็วภายใน 1-4 ชั่วโมง เมื่อเซลล์นิวโทรฟิลมาถึงยังบริเวณติดเชื้อ เซลล์จะเข้าจับเชื้อโดยอาศัยแอนติบอดีที่จับ receptor ที่จำเพาะ เช่น IgG receptors และนำไปสู่การจับกิน (phagocytosis) ต่อมาเชื้อใน phagosome จะถูกย่อยเมื่อมี lysosome granules ซึ่งมีน้ำย่อยและเอนไซม์หลายชนิดเข้ามารวมเป็น phagolysosome ทำให้สามารถฆ่าและทำลายเชื้อภายในเซลล์นิวโทรฟิลได้ ในเวลาใกล้เคียงกันยังพบว่ามีกระบวนการ oxidative burst ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากออกซิเจนที่เป็นพิษต่อเชื้อโรค การติดเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น เชื้อเอชไอวี เชื้อหัด พบว่าสามารถทำให้ขบวนการดังกล่าวบางขั้นตอนหรือทั้งหมดบกพร่องได้ (70)

ความบกพร่องของนิวโทรฟิลจากการติดเชื้อไวรัสนั้นเกิดขึ้นได้ทั้งในด้านคุณภาพของการทำงานที่ลดลงหรือจำนวนเม็ดเลือดขาวที่ลดลง (neutropenia) ซึ่งโดยทั่วไปหมายถึงนิวโทรฟิลมีจำนวนลดลงน้อยกว่า 1,000 เซลล์ต่อเลือด 1 mm³ ซึ่งจะสัมพันธ์กับแบบผกผันกับโอกาสการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (71) โดยเฉพาะการติดเชื้อแบคทีเรียแบบซ้ำซ้อนและการติดเชื้อราบริเวณผิวหนังและเยื่อหู (72-74) เช่น *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *E. coli*, *Pseudomonas* และ candidal species อย่างไรก็ตามการติดเชื้อดังกล่าวในที่สุดจะสามารถแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือดและทำให้เสียชีวิตได้ การป้องกันการติดเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ชนิดคุกคามซึ่งต้องอาศัยนิวโทรฟิลเป็นองค์ประกอบสำคัญ (75) ก็พบว่ามีรายงานในผู้ติดเชื้อเอชไอวีโดยไม่มีปัจจัยเสี่ยงอื่นมาเกี่ยวข้องได้ (76-78) นอกจากนี้ยังพบรายงานอุบัติการณ์ปอดติดเชื้อ (72-74) ถ้าใส่อกเสบ (73-74) ท่อปัสสาวะอักเสบ (74) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (73-74) และฝีบริเวณผิวหนัง (73-74, 79) เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีโดยเฉพาะในเด็ก รายงานของ Polski และคณะ

(80) ยังแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยเอดส์มีความเสี่ยงในการเกิดปอดอักเสบติดเชื้อจากแบคทีเรียสูงชันกว่าประชากรทั่วไปถึง 8 เท่า นอกจากนี้การตอบสนองที่ลดลงหลังได้รับสาร G-CSF ระหว่างการติดเชื้อรา aspergillosis (81) ยังช่วยชี้บ่งถึงปัจจัยสำคัญที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อดังกล่าวนี้ น่าจะมีผลจากการทำงานของนิวโทรฟิลที่แย่งในผู้ติดเชื้อเอชไอวี

การตรวจหน้าที่การทำงานของเม็ดเลือดนิวโทรฟิลในผู้ติดเชื้อเอดส์นั้น จะพบความผิดปกติของ chemotactic (79, 82-83) และ secretory function (79) ได้ในขณะที่ยังมีหน้าที่ในด้าน bactericidal (5, 83-84) oxidative (82) และ phagocytic function (83-84) ปกติอยู่ได้ สำหรับความผิดปกติของ chemotaxis นั้นพบว่าเซลล์นิวโทรฟิลจะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย fMLP (N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine), casein และ leukotriene B4 ลดลงขณะที่กระบวนการ degranulation ก็ลดลงเมื่อใช้ leukotriene B4 เป็นตัวกระตุ้นด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยเพื่อดูหน้าที่ของนิวโทรฟิลในอิตาลีพบว่าผู้ติดเชื้อเอดส์ที่ยังไม่แสดงอาการยังมีการลดลงของกระบวนการจับกิน (phagocytosis) และฆ่าเชื้อรา candida ได้เช่นกันในขณะที่หน้าที่ chemotaxis ยังพบว่าปกติ (84) ในกลุ่มรกร่วมเพศพบความผิดปกติของ chemotaxis โดยยังแสดงการจับกินและการฆ่าเชื้อโรคปกติ จึงเป็นไปได้ว่าความผิดปกติในหน้าที่การทำงานของเม็ดเลือดนิวโทรฟิลที่พบในผู้ติดเชื้อเอดส์ น่าจะมาจากปัจจัยอื่นในน้ำเหลืองมากกว่าเกิดความผิดปกติจากเซลล์นิวโทรฟิลเอง เช่น ระดับ IgA ซึ่งมีรายงานพบว่าเมื่อมีระดับสูงขึ้นจะทำให้กระบวนการ chemotaxis ของนิวโทรฟิลในผู้ป่วยลดลงได้ (85) หรือเป็นผลมาจาก cytokines อื่นซึ่ง IL-17 เป็นไซโตไคน์อีกตัวที่น่าสนใจว่าอาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อความผิดปกติของนิวโทรฟิล

ในขณะนี้แม้ว่าข้อมูลของ IL-17 จากผลการศึกษาจะแสดงว่า IL-17 มีบทบาทต่อการอักเสบด้วยหน้าที่ของ proinflammatory cytokine เป็นส่วนใหญ่ ทั้งที่พบในภาวะข้ออักเสบเรื้อรัง (86-88) ทางเดินหายใจอักเสบ (89) organ allograft rejection (65) multiple sclerosis (90) และการติดเชื้อ Klebsiella pneumoniae ซึ่งบทบาทด้านการต้านเชื้อโรคโดยตรงยังมีข้อมูลน้อยมาก อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า IL-17A เป็นไซโตไคน์ที่สามารถกระตุ้นให้มี β -defensin-2 (hBD-2) expression และ MIP-3 เพิ่มขึ้นอย่างแรง (91) ซึ่งทั้ง hBD-2 และ MIP-3 มีบทบาทจำเป็นในระบบ airway innate immunity (92-93) เนื่องจาก hBD-2 ทำหน้าที่ดึงดูดให้เซลล์ immature dendritic cells และ memory T cells เข้ามารวมตัวกัน และมีฤทธิ์ต้านเชื้อโรค (92) เมื่อมีการประสานงานกันระหว่าง IL-17A, hBD-2 และ MIP-3 ทำให้มีการกระตุ้นและดึงนิวโทรฟิลเข้ามากำจัดแบคทีเรีย มีการส่งแอนติเจนเข้าสู่กระบวนการ antigen presentation และกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันทั้งเซลล์เข้ามาจัดการกับเชื้อโรคได้

สำหรับบทบาทในด้าน proinflammatory cytokines นั้นพบว่าในภาวะข้ออักเสบเรื้อรังจากเชื้อ B. burgdorferi หรือ Chlamydia trachomatis (24) นั้น เชื้อโรคจะอาศัยการกระตุ้น IL-17 อย่างต่อเนื่องซึ่งพบว่า Th cells ในน้ำเลี้ยงข้อที่อักเสบจะแสดง co-expression ของทั้ง IL-17 และ TNF- α และสามารถตอบสนองแบบ polyclonal stimulation ซึ่งไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อ จึงเกิดการทำลายข้อตามมา การกระตุ้นกลับไปกลับมาระหว่าง IL-17 และ IL-6 ซึ่งพบได้ในหลอดทดลองยังสามารถนำมาใช้อธิบายพยาธิกำเนิดจากภาวะข้ออักเสบเรื้อรังได้เช่นกัน ดังตัวอย่างในโรค Lyme disease (94-95) ดังนั้น IL-17 อาจนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาเพื่อลดการอักเสบที่เกิดขึ้นเรื้อรังในโรคบางชนิดได้ สำหรับการติดเชื้อเอชไอวีซึ่งเป็นการเจ็บป่วยเรื้อรังและก่อให้เกิดความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันจนทำให้คนไข้ติดเชื้อฉวยโอกาสบางชนิดได้ง่าย ผู้ติดเชื้อเอชไอวีจึงเป็นกลุ่มประชากรที่น่าสนใจในการตรวจหาความสัมพันธ์ของ IL-17 และจำนวน CD4+ T cells ที่เปลี่ยนแปลงไปในกลุ่มผู้ติดเชื้ออาจนำมาพิจารณาความสัมพันธ์กับการ expression ของ IL-17 ได้เนื่องจากเซลล์ส่วนใหญ่ที่สร้าง IL-17A คือเซลล์ CD4+ T lymphocytes จึงคาดว่า การติดเชื้อเอชไอวีที่มีระดับ CD4+ T cells ต่ำน่าจะมีระดับ IL-17 ต่ำลงเช่นกันและส่งผลให้เกิดภาวะ neutrophil dysfunction ซึ่งพบในผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งรายงานไว้ (81) ด้วยข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันแม้ว่ายังไม่สามารถระบุปัจจัยที่มีผลต่อ neutrophilic dysfunction ได้โดยตรงอย่างชัดเจน แต่ผลการศึกษางานบางรายงานระบุว่าสามารถเกิดจากโปรตีนของเชื้อเอชไอวี (4, 96-97) transforming growth factor- β (98) หรือ cytokines จาก Th2 type เช่น IL-4 หรือ IL-10 ซึ่งมีผลลดการทำงานของ phagocytes (99-100) หรือ IFN γ ที่ลดลงจากความผิดปกติในการทำงานของ Th1 ซึ่งมีผลต่อภาวะผิดปกติของ phagocytes (101-102) นอกจากนี้การวิจัยที่ผ่านยังไม่พบผลกระทบโดยตรงจากการใช้ยาต้านเชื้อไวรัส (antiretroviral drug) ต่อภาวะผิดปกติของการทำงานของนิวโทรฟิล ถ้าตัดปัจจัยเรื่องจำนวน CD4+ T cells ที่เปลี่ยนแปลง (81) ดังนั้นจึงเป็นที่มาของสมมติฐานเพื่อตรวจสอบในการศึกษานี้ ในการพิจารณาการความสัมพันธ์ของ IL-17 expression และระดับ CD4+ cell count ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีโดยไม่คัดผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่กำลังได้รับยาต้านเชื้อไวรัสจากการศึกษาวิจัยแต่คำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของนิวโทรฟิลที่สำคัญคือระดับเม็ดเลือด CD4+ T cells เป็นหลัก

บทที่ 3

เทคนิคการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ (Intracellular Cytokine Staining)

องค์ความรู้ในด้านภูมิคุ้มกันวิทยาในปัจจุบันสามารถจำแนกเซลล์ที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน ด้วยลักษณะของโปรตีนและโมเลกุลที่จำเพาะซึ่งอยู่ที่เปลือกนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ (surface markers) และภายในเซลล์ทั้งที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในกระบวนการและเป็นผลิตภัณฑ์ในการส่งสัญญาณ (signaling process) เพื่อการป้องกันตัวหรือตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามเซลล์ที่มีลักษณะของ surface phenotype เหมือนกันอาจสังเคราะห์สารผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันและมีหน้าที่แตกต่างกันในระบบภูมิคุ้มกันได้ ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดได้แก่การพยายามจะบ่งชี้ เซลล์ CD4+ T helper cells ให้เป็นกลุ่มย่อยได้แก่ Th1 หรือ Th2 จากชนิดของไซโตไคน์ที่เซลล์สร้างขึ้นต่างกันหรือในสัดส่วนที่ต่างกันหลังถูกกระตุ้น ซึ่งเดิมใช้วิธีตรวจสอบไซโตไคน์จากสารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ต้องส่งสัย (culture supernatants) ด้วยวิธี enzyme-linked immunoassay (ELISA) ข้อเสียของวิธีนี้เกิดจากกลุ่มเซลล์ที่นำมาตรวจ (ex vivo) มีลักษณะ heterogeneous ร่วมกับการสร้างกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงให้เป็น clone เดียวกัน (homogeneous) ต้องอาศัยเทคนิคทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อนขึ้น นอกจากนี้เซลล์เป้าหมายที่ต้องการจากวิธีดังกล่าวยังมีปริมาณน้อยไม่คุ้มทุนในการศึกษา ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีตรวจหาใหม่ ๆ เพิ่มขึ้น ได้แก่ ELISA-based assay for detecting cells secreting analyte (ELISPOT), Reverse-transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR), Limiting dilution analysis (LDA), In situ hybridization (ISH), Immunohistochemistry และ Intracellular cytokine staining (ICCS)

วิธี ELISPOT, LDA และ intracellular cytokine staining (ICCS) เป็นเทคนิควิธีตรวจที่น่าจะมีความเหมาะสมที่สุดในการตรวจหาสัดส่วนของเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ที่สนใจ (103) โดยความไวในการตรวจมีความแตกต่างกัน ดังนี้ ELISPOT ตรวจวัดปริมาณของโปรตีนที่หลั่งออกจากเซลล์ RT-PCR ตรวจวัดระดับของ mRNA ที่ถูกกระตุ้นแบบกึ่งปริมาณ ขณะที่วิธี ISH และ immunohistochemistry มีประโยชน์ในการระบุตำแหน่งของเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ที่สนใจในเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ รายละเอียดสรุปไว้ในตารางที่ 2

วิธี ICCS ได้เริ่มนำมาใช้โดย Anderssons ในกรุงสตอกโฮล์ม เมื่อปี 2523 โดยเริ่มจากการย้อมเนื้อเยื่อที่ตัด section (104) ต่อมาจึงมีการเสนอวิธี fix เซลล์ให้คงรูปร่างกลมและเจาะรูเยื่อหุ้มเซลล์ของลิมโฟไซต์ นำมาสู่ขั้นตอนยับยั้งการหลั่งของไซโตไคน์ให้กักเก็บไว้ในเซลล์ และได้พยายามปรับปรุงสัดส่วนจากสัญญาณในเซลล์ต่อสิ่งรบกวนให้ดีขึ้นเพื่อช่วยในการแปลผล (105-106)

ในที่สุดเมื่อมีการนำ monoclonal antibodies ที่จำเพาะต่อไซโตไคน์ที่สนใจมาใช้จึงทำให้วิธีย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ได้รับการพัฒนาจนเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน (107) ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ผลร่วมกับเทคนิคของ flow cytometry การย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์จึงสามารถนำมาใช้กับเซลล์ต่าง ๆ ได้มากขึ้นทำให้เราทราบลักษณะจำเพาะของเซลล์ในแต่ละกลุ่มได้ และถ้าพิจารณา co-expression ของไซโตไคน์ที่ต่างกันด้วยการย้อมสีหลายสีทำให้แยกเซลล์ในกลุ่มย่อยได้มากขึ้นตามชนิดของไซโตไคน์ที่สร้างขึ้นเพิ่มเติมจาก surface markers ที่ย้อมได้จากวิธี ELISA ในปัจจุบันเทคนิค flow cytometry อาศัยคอมพิวเตอร์มาช่วยทำให้ง่ายและรวดเร็วขึ้นทำให้ ICCS เป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ผลในด้านคลินิกและงานวิจัยในปัจจุบัน

ตารางที่ 2 สรุปลักษณะวิธีการตรวจหาไซโตไคน์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ

Technologies	Analyte	Readout	Equipment	Cytokine Coexpression	Cell Surface Phenotype
ICCS	Protein	Frequency	Flow cytometry	Yes	Possible
ELISPOT	Protein	Frequency	Microscope or plate reader	Yes (difficult)	Pre-selection
ELISA	Protein	Integrated amount	Spectrophotometer	No	Pre-selection
RT-PCR	mRNA	Integrated amount	Thermal cycler	No	Pre-selection
LDA	Protein	Frequency	Spectrophotometer	Yes	Possible
ISH	mRNA	Localization	Light/ electron microscopy	Yes	Possible
Immuno-histochemistry	Protein	Localization	Light/ electron microscopy	Yes	Possible
Immuno-cytochemistry	Protein	Localization	Confocal microscopy or electron microscopy	Yes	Possible
RNA protection assay	mRNA	Integrated amount	Gel set-up, phosphorimager	No	Pre-selection

ELISA: enzyme-linked immunoassay, ELISPOT: ELISA-based assay for detecting cells secreting analyte, RT-PCR: reverse-transcription followed by polymerase chain reaction, LDA: limiting dilution analysis, ISH: in situ hybridization, ICCS: intracellular cytokine staining

เทคนิคขั้นตอนในการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ต้องอาศัยการพัฒนาวิธีการในห้องปฏิบัติการซึ่งในแต่ละแห่งอาจมีความต่างกันในรายละเอียด วัสดุอุปกรณ์บางชนิด ด้วยปัจจัยของเซลล์และไซโตไคน์ที่สนใจศึกษา อย่างไรก็ตามมีหลักการและกระบวนการศึกษาเหมือนกันเป็นมาตรฐาน พอสรุปได้โดยสังเขปดังรูปที่ 5

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็น

สารกระตุ้นเซลล์ เช่น PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), Ionomycin, Calcium ionophore A23187, PHA เป็นต้น

สารยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ออกนอกเซลล์ ได้แก่ Brefeldin A, Monensin

สาร fix เซลล์ให้คงรูปทรงกลม เช่น Formaldehyde

สารสำหรับเจาะรูเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น Saponin

สาร Buffers PBS

สาร Antibodies ถ้าใช้ monoclonal antibodies จะลดปัญหาการติดอย่างไม่จำเพาะของสารทำให้สามารถแปลผลได้ง่ายขึ้น โดยทั่วไปแอนติบอดีที่นำมาใช้จะ conjugated กับสี Fluorescence เช่น PE-, FITC, APC หรือ biotin conjugates โดยควรเก็บสี PE ไว้ย้อมกับไซโตไคน์ที่ให้สัญญาณอ่อน (weakest signals) เช่น IL-4

3.2 ขั้นตอนการกระตุ้นเซลล์ในหลอดทดลอง

การเลือกสารที่นำมาใช้กระตุ้นมีความสำคัญเนื่องจากเซลล์ที่อยู่ใน steady state อาจต้องใช้สารกระตุ้นที่ไม่จำเพาะอย่างสารกลุ่ม mitogen เนื่องจาก mitogen สามารถกระตุ้นเซลล์ได้แบบ polyclonal activation ทำให้ได้ผลการกระตุ้นในระดับสูงและเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ในกรณีที่เราไม่ทราบตัวกระตุ้นที่จำเพาะสำหรับเซลล์ในสภาวะที่เหมาะสมที่กำลังศึกษาอาจพิจารณาใช้สาร PHA หรือ anti CD3 และ CD28 สำหรับกระตุ้น T cells กรณีที่ทราบแอนติเจนที่จำเพาะ อาจใช้แอนติเจนนั้น ๆ หรือเลี้ยงรวมกัน (co-culture) กับ antigen presenting cells เพื่อพิจารณาการตอบสนองของเซลล์ใน clone ที่กำลังศึกษา อย่างไรก็ตามเซลล์ที่อยู่ในภาวะถูกกระตุ้นแล้ว เช่น เซลล์ PBMC จากคนที่ติดเชื้อเรื้อรัง การเลือกสารที่กระตุ้นอาจไม่สำคัญยกเว้น กรณีไซโตไคน์ที่ศึกษามีระดับต่ำ กระตุ้นยาก การใช้ mitogen อาจทำให้เห็นความแตกต่างได้ชัดเจนกว่าการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะ (ดังแสดงในรูปที่ 5) แต่การแปลผลต้องระวังเนื่องจากไม่ใช่ภาวะ physiological

stimuli ซึ่งเกิดขึ้นในร่างกายได้จริง ไซโตไคน์หลายชนิดถูกกระตุ้นออกมาอย่างกว้างขวางและมากกว่าปกติ ผลที่ได้จึงอาจไม่สามารถอธิบายผลจากไซโตไคน์ที่สนใจได้เพียงอย่างเดียวซึ่งถือว่าข้อดีของการใช้ mitogen กระตุ้น

การกระตุ้นด้วยสาร PMA และ ionophore (ionomycin หรือ calcium ionophore A23187) ถือเป็นวิธีการกระตุ้นเซลล์อย่างแรงมากเนื่องจากสารดังกล่าวจะไปออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ protein kinase C (PKC) ทำให้เกิด calcium ion influx จึงเหมาะที่จะใช้ในการกระตุ้นเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นมาแล้วจาก physiological stimuli หรือใช้ในกรณีเป็น positive control เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่อาจจะตอบสนองได้ไม่ดี หรือมี cytokine expression ไม่ชัดเจนจากการกระตุ้นด้วยสารอื่นซึ่งมักเป็นแอนติเจนที่จำเพาะ ในกรณีที่เลือก PHA หรือ superantigen เช่น Staphylococcal enterotoxin B (SEB) กระตุ้น T cells ควรใช้ antigen presentation cells และต้องระวังการตกตะกอนของเซลล์ก่อนนำไป fix เซลล์เพื่อป้องกันตัวทวนและอาจเกิดการอุดตันขณะตรวจนับเซลล์ผ่าน flow cytometry

เวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์มีความสำคัญมาก เวลาที่เหมาะสมสำหรับสารที่ใช้กระตุ้นแต่ละชนิดนั้นไม่เท่ากันเนื่องจาก T cells จะเข้าสู่ระยะ refractory phase หลังจากถูกกระตุ้น เซลล์ใน T cell lines จะยังอยู่ในภาวะถูกกระตุ้นได้ต่อเนื่องในหลอดทดลองประมาณ 7-10 วันจึงจะสามารถกระตุ้นได้ใหม่ สำหรับการกระตุ้นด้วย mitogen เช่น PMA และ ionomycin นั้นเวลาที่ใช้ในการ incubation เพียง 4-6 ชั่วโมงนั้นเพียงพอสำหรับการศึกษาไซโตไคน์เกือบทุกชนิด แต่ต้องคำนึงถึงระบบทางห้องปฏิบัติการของแต่ละแห่งเพื่อประเมินผลตอบสนองอีกครั้ง สิ่งที่ต้องระวังคือเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารดังกล่าวบางส่วนจะตายเมื่อ incubation ให้นานกว่า 24 ชั่วโมงซึ่งส่งผลต่อการแปลผลโดยรวม เนื่องจากเซลล์ที่ตายจะปล่อยสาย DNA ออกมานอกเซลล์และจะไปจับกับเซลล์ข้างเคียงทำให้เกิดตะกอน การใส่เอนไซม์ DNase ในสัดส่วน 1:25 และ incubate ไว้ประมาณ 5 นาทีจะช่วยป้องกันการเกิดตะกอนได้ การติดตามสัดส่วนของเซลล์ที่ตายเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมย่อมมีส่วนสำคัญในการเตรียมขั้นตอนการศึกษา

วิธีการป้องกันการหลั่งไซโตไคน์ออกจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นเพื่อให้มีการกักเก็บไซโตไคน์ไว้ในเซลล์เป็นอีกขั้นตอนที่สำคัญของเทคนิคการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ สารที่นำมาใช้ได้แก่ brefeldin A หรือ monensin ไซโตไคน์ที่สร้างตอบสนองต่อการกระตุ้นจะถูกเก็บไว้ใน golgi complex ระยะเวลาที่ใช้สำหรับการหยุดการหลั่งไซโตไคน์จากสารดังกล่าวคือ 4-6 ชั่วโมง จึงสามารถใส่ไปพร้อมกับสารกระตุ้นที่กล่าวมาแล้ว ถ้าใช้เวลาในการกระตุ้นเพียง 4-6 ชั่วโมง อย่งไรก็ตามสาร monensin มีพิษต่อเซลล์ถ้าใส่ทิ้งไว้ยาวนานกว่า 12 ชั่วโมง

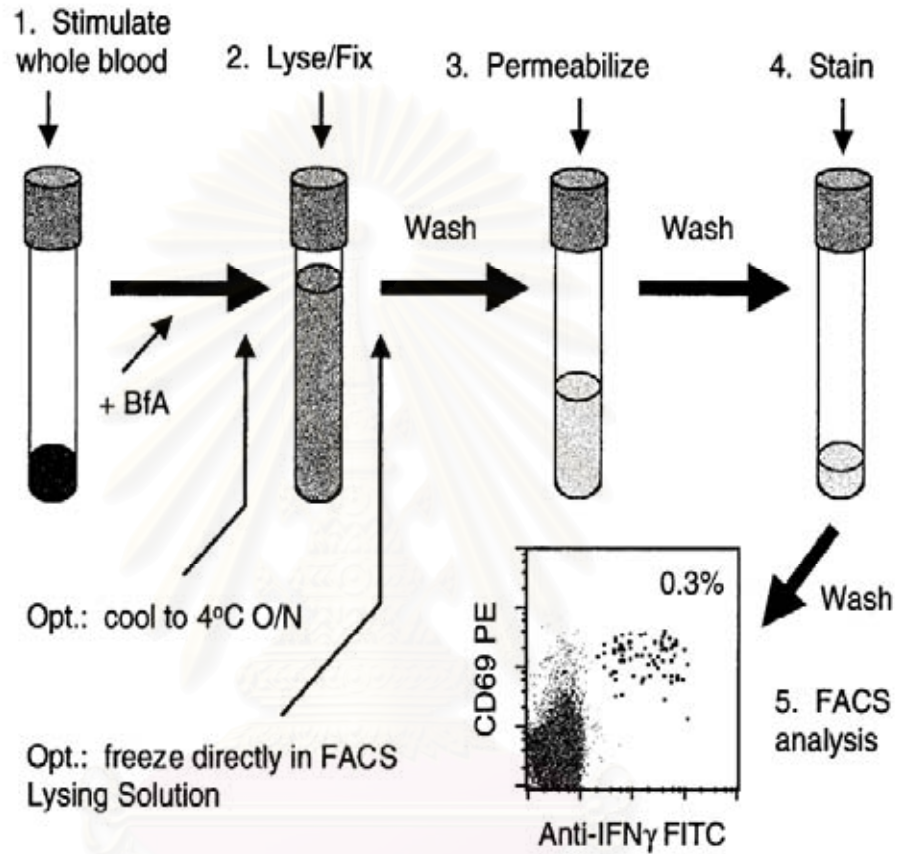
สำหรับการกระตุ้นที่จำเพาะอาจต้องใช้ TCR crosslink ผ่าน plate-bound anti-CD3 และ anti-CD28 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อน หรือเพื่อให้แสดงการตอบสนองที่มากขึ้น อาจต้องมีการกระตุ้น

ด้วยด้วย IL-2 และ IL-4 เป็นเวลา 3 วันก่อนนำไปกระตุ้นด้วย PMA และ Ionophore ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น การใช้เซลล์ที่มีความจำเพาะ เช่น T cell lines หรือ clones ควรใช้ antigen และ antigen presenting cells (APCs) เพื่อให้สภาพเหมาะสมในการแบ่งตัวของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น จาก cell to cell contact และ cytokines ที่ถูกหลั่งออกมาจาก APCs

3.3 ขั้นตอนการ Fixation และการเจาะรู Permeabilization ของเยื่อหุ้มเซลล์

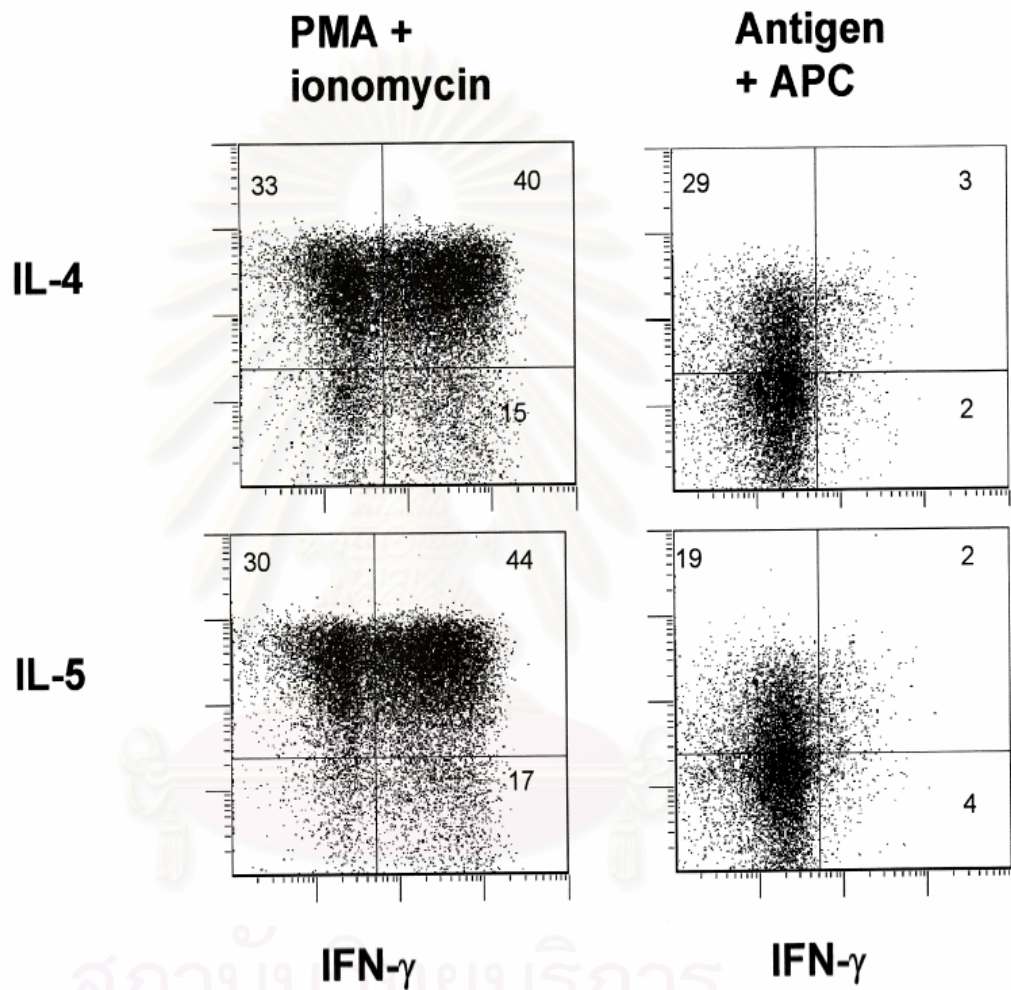
การ fix เซลล์ให้คงรูปทรงกลมด้วยสาร Formaldehyde จะทำให้ไซโตไคน์ในเซลล์ยังคงลักษณะจำเพาะ (antigenicity) ได้ เนื่องจากการกระจายของสารนั้นภายในเซลล์ยังคงอยู่เพื่อการจับอย่างจำเพาะของแอนติบอดีที่คิดสิจจึงไม่น่าจะเพิ่มสัญญาณ background จากสีที่ติดอย่างไม่จำเพาะในตัวเซลล์เอง (increase in autofluorescence) แต่ในความเป็นจริงการ fixation จะทำให้เกิด autofluorescence เพิ่มขึ้นจากการจับกับแอนติบอดีที่ไม่จำเพาะ ดังนั้นเซลล์ที่ผ่านการ fix จะเปล่งสีได้เพิ่มขึ้น จึงจำเป็นต้องมี negative control เสมอ ขั้นตอนนี้ใช้เวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง สำหรับการเจาะรูเยื่อหุ้มเซลล์จะใช้สาร saponin ซึ่งแม้ว่าปัจจุบันจะมีการนำน้ำยาทั้งสองชนิดผสมกันและลดขั้นตอนการทำ แต่เนื่องจากเซลล์ที่ผ่านการ fixation สามารถเก็บไว้อีกระยะหนึ่งถึง 3 วันก่อนจะนำมาเจาะรู การแยกขั้นตอนทั้งสองอาจได้ประโยชน์เมื่อต้องย้อมเซลล์จำนวนมากหลายตัวอย่างการศึกษา การเจาะรู (permeabilization) ควรตั้งทิ้งไว้ในที่มีดอย่างน้อย 10 นาที การปั่นล้างเซลล์ในแต่ละขั้นตอนด้วย buffer ที่มี sodium azide ก่อนใส่ น้ำยาจะทำให้ป้องกันการตกตะกอนและลดตัวกวนเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วย flow cytometry

รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์โดยสรุปซึ่งประกอบด้วย การกระตุ้นเซลล์ในหลอดทดลอง การ fix ให้เซลล์คงรูปร่าง การเจาะรูเซลล์ การย้อมสี และตรวจนับเซลล์ที่ต้องการศึกษาด้วยวิธี Flow cytometry



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 แสดงสัดส่วนการ expression ของ IL-4 และ IL-5 ภายในเซลล์จากการนับเซลล์ด้วยเทคนิค Flow Cytometry เห็นได้ว่าเมื่อใช้สารกระตุ้นต่างกันจะได้ผลตอบสนองไม่เท่ากัน PMA/Ionomycin เป็น mitogen ที่กระตุ้นได้แรงกว่าการใช้แอนติเจนที่จำเพาะ (103)



3.4 การย้อม surface markers บนผิวเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

โดยทั่วไป T cells จะแสดงลักษณะบนผิวเซลล์อันได้แก่ CD3, CD4 และ CD8 เป็นต้น การย้อมสี surface markers เหล่านี้ควรทำก่อนทำการ fix เซลล์ เนื่องจาก epitopes ที่ surface markers อาจจะถูกทำลายเมื่อผ่านกระบวนการ fixation และ permeabilization ยิ่งไปกว่านั้น surface markers บางตัวยังอาจลดจำนวนลง (downregulation) เมื่อเซลล์ผ่านการกระตุ้นให้มีการสร้างไซโตไคน์ที่ต้องการศึกษา จึงเป็นไปได้ว่า surface markers อาจไม่ใช่ลักษณะที่จำเพาะเพื่อแสดงว่าเป็นกลุ่มเซลล์ที่ต้องการศึกษาได้เสมอไปหลังจากเซลล์นั้นถูกกระตุ้นแล้ว ตัวอย่างเช่น CD4 เป็น marker ของ T

cells ที่เปลี่ยนแปลงลดจำนวนลงอย่างมากหลังเซลล์ผ่านการกระตุ้นด้วย PMA และ ionomycin (108-110) จากการศึกษาพบว่า monensin สามารถลด downregulation ของ CD4 ได้แต่ monensin ขนาดสูง (50µM) จะส่งผลกระทบต่อ expression ของ IFN-gamma ภายในเซลล์ (103) สำหรับ surface markers ตัวอื่น เช่น CD3, TCR (111) และ CD8 (112) สามารถพบการเปลี่ยนแปลงหลังกระตุ้นได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามเราสามารถตามไปย้อม CD3 ภายในเซลล์หลังกระตุ้นได้เช่นกันเนื่องจาก CD3 จะเข้าไปเซลล์โดยไม่ถูกทำลายหลังการกระตุ้น T cells ด้วย PMA สำหรับบางกรณี monensin ในขนาดสูงสามารถจะป้องกันการทำลาย endosome ได้แต่จะไปยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ในเซลล์เช่นกัน ดังนั้นบางครั้งการย้อม surface markers ให้ได้คืออาจทำให้การย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ไม่ติดก็ได้ การแยกเซลล์ที่มี surface marker ที่สนใจก่อนนำไปกระตุ้นอาจเป็นทางเลือกที่ดีแม้ว่าจะต้องเพิ่มขึ้นตอนมากขึ้นก็ตาม สำหรับ CD4 marker นั้นบางรายงานใช้วิธี ดูเซลล์ที่ติด CD3 แต่ไม่ติด CD8 แทนเพื่อให้ผลออกมาดีขึ้นแต่ต้องไม่ลืมว่า CD4-CD8- T cells สามารถพบได้และอาจเป็นตัวกวนการแปลผลได้ ดังนั้นถ้าไม่จำเป็นต้องกระตุ้นด้วยเซลล์อื่นก่อน การแยกเซลล์ไว้ก่อนนำมากระตุ้นน่าจะเหมาะกว่า เช่นแยกเซลล์ CD4+ T cells ไว้ก่อนแล้วค่อยเริ่มวิธีกระตุ้น

3.5 การย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์

ปัจจุบันมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไซโตไคน์ที่ต้องการศึกษาติดสี fluorescence หลายชนิดให้เลือก ถ้าไม่มีชนิดติดสีสำเร็จรูปให้พิจารณานำแอนติบอดีต่อแอนติบอดีดังกล่าวที่ติดสีซึ่งผลิตมาจากคนหรือสัตว์ชนิดเดียวกันมาย้อมซ้ำอีกครั้ง การย้อมแต่ละครั้งควรทิ้งไว้ในที่เย็นเป็นเวลาอย่างน้อย 20-30 นาที เนื่องจากการเจาะรู (permeabilization) จะทำให้เพิ่มโอกาสที่โปรตีนจะมีปฏิกิริยาอย่างไม่จำเพาะ อย่างไรก็ตามสามารถหลีกเลี่ยงลดปฏิกิริยานี้ได้โดยการปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีที่นำมาย้อมในขั้นตอนต่อไป โดยทั่วไปมักให้ความเข้มข้น 0.5-5 µg/ml นอกจากนี้การ block Fc receptor ด้วย IgG หรือ anti Fc Ab อาจช่วยลดตัวกวนจากปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ การทำ isotype-match control จะได้ประโยชน์น้อยเมื่อเทียบกับการล้าง และย้อมด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะที่ใช้ขณะย้อม ไซโตไคน์บางชนิด เช่น IL-1B และ IFN-gamma ในปริมาณน้อย อาจจับที่บริเวณผิวเซลล์และภายในเซลล์ (113-114) ซึ่งทำให้ต้องพัฒนาเทคนิคในการย้อมเพื่อแยกตำแหน่งของไซโตไคน์ที่ต้องการศึกษาด้วยการมี permeabilisation control ด้วยการใส่ anti-vimentin หรือ anti-Beta-actin

3.6 การนับเซลล์และสัดส่วนที่แสดงการติดสีย้อมไอโซโตโคนด้วย Flow cytometry

เครื่อง Flow cytometer สร้างขึ้นโดย Kemensky เมื่อ ปี พ.ศ. 2513 โดยใช้ helium-neon และ argon ion laser เป็นแหล่งกำเนิดแสง ปัจจุบันใช้แสงเลเซอร์ที่มีกำลังสว่างตั้งแต่ 9.5 มิลลิวัตต์ถึง 5 วัตต์และ ช่วงคลื่นระหว่าง 450 ถึง 680 นาโนเมตร หลักการของ Flow cytometry หรือ Flow cytofluorimetry อาศัยลำแสงเลเซอร์ยิงกระทบเซลล์ที่ถูกจัดให้วิ่งผ่านหลอดแก้วซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางแคบร่วมกับ sonic vibrator ในกรวย nozzle ซึ่งจะส่งคลื่นมากระทบเซลล์ให้แยกตัวออกจากกัน เซลล์จึงวิ่งผ่านได้ทีละเซลล์ลำแสงเลเซอร์ที่กระทบสารเรืองแสงจะเกิดลำแสงและประจุไฟฟ้าผ่านไปยังเครื่องรับแสง ส่งข้อมูลไปเก็บไว้ที่คอมพิวเตอร์และวิเคราะห์ผลทางจอภาพแบบอัตโนมัติ ลำแสงที่สะท้อนไปข้างหน้า เรียกว่า forward angle light scatter (FALS หรือ FSC) จะวัดขนาดของเซลล์ ส่วนลำแสงสะท้อนในทิศทาง 90 องศาเรียกว่า 90° light scatter (90° LS) หรือ side scatter (SSC) เป็นลำแสงที่หักเหออกมาจากภายในเซลล์ สัญญาณนี้จึงวัดความหนาแน่นภายในเซลล์ (cytoplasmic granularity) สารเรืองแสงที่ย้อมติดสิ่งที่ต้องการศึกษาเมื่อถูกแสงเลเซอร์กระทบก็จะอยู่ใน excitation state เกิดแสงในคลื่นสีต่าง ๆ และตรวจนับโดยเครื่องตรวจนับซึ่งอาจเพิ่มสัญญาณจาก photomultiplier tubes (PMT) ที่ต่อเข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์

เครื่องจึงสามารถนับเซลล์ แยกชนิดของเซลล์ วัดปริมาณสารเรืองแสงที่อยู่บนผิวเซลล์และภายในเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถวัดขนาดและความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณ DNA, RNA, โปรตีนและ intracellular parameters อื่น ๆ ที่เกิดขึ้นหลังเซลล์ถูกกระตุ้นได้ ปัจจุบันอย่างน้อยเครื่องสามารถวัด 3-4 สี จึงสามารถตรวจ parameters ต่าง ๆ ได้พร้อมกัน 3-4 ชนิดจากการตรวจวัดสี fluoscence และแสดงเป็น scatter plot ของ events gates ได้ทั้ง surface marker และ cytokine ที่ต้องการศึกษา ทำให้สามารถตรวจสอบเซลล์ที่นำมาศึกษาว่าเป็นกลุ่มที่ต้องการได้ ผลที่ได้จะแสดงเป็นความถี่หรือสัดส่วนของเซลล์ในกลุ่มศึกษาที่สร้างไอโซโตโคนที่จำเพาะจึงสามารถนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ ตัวอย่างดังรูปที่ 6 นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาการ co-expression ของไอโซโตโคนต่างชนิดกันในเซลล์กลุ่มเดียวกันได้ โดยไม่ยุ่งยากและวุ่นวายกับการ cloning เนื่องจากอาศัยการตรวจเซลล์จากสิ่งมีชีวิตได้โดยตรง (ex vivo) อย่างไรก็ตามวิธี Flow cytometry ยังมีข้อจำกัดที่สำคัญได้แก่

- กระบวนการเจาะรูมักจะก่อให้เกิดภาวะ autofluorescence ทำให้การประเมินต้องมีการเปรียบเทียบกับ negative และ positive controls เสมอ
- แอนติบอดีที่นำมาใช้ส่วนใหญ่จะไม่จับกับไอโซโตโคนหรือ surface markers ที่ต้องการศึกษาอย่างทีคาดไว้โดยเฉพาะกับเซลล์ที่ผ่านการ fixation และ

กระบวนการเจาะรูที่ผิวเซลล์มาแล้ว ทำให้ต้องมีการเตรียมการในแง่การวิเคราะห์ ผลก่อนลงมือศึกษาเสมอ

- ไซโตไคน์บางตัว expressed ในระดับต่ำจึงมักให้ค่าแยกกลุ่มได้ไม่ชัดเจน จึงต้องมี negative control เปรียบเทียบก่อน
- การสร้างไซโตไคน์ของเซลล์ที่ต้องการศึกษาอาจไม่เกิดขึ้นตลอด ซึ่งการสร้าง ปริมาณเล็กน้อยอาจเกิดเนื่องจากเซลล์ที่ใช้มักมาจากเลือด (PBMC) ซึ่งไม่ใช่เซลล์ ที่อยู่ในบริเวณที่มีการอักเสบหรือมีพยาธิสภาพ นอกจากนี้การสร้างไซโตไคน์ใน เซลล์ชนิดเดียวกันที่แม้จะเป็น clone เดียวกัน หรืออยู่ในกลุ่มเดียวกัน จากตำแหน่ง เดียวกันอาจไม่จำเป็นต้องเกิดขึ้นเหมือนกัน หรือสร้างไซโตไคน์ต่างชนิดกัน ได้ ยิ่ง ทำให้ผลที่ได้ อาจไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ (107)
- การศึกษา co-expression ของไซโตไคน์ในเซลล์เดียวกันอาจถูกจำกัดเนื่องจากไซ โตไคน์ดังกล่าวอาจถูกสร้างเป็นลำดับไม่พร้อมกัน จึงอาศัยเทคนิคนี้ไม่ได้

การย้อมไซโตไคน์ในเซลล์เป็นวิธีที่มีความไวมากกว่า ELISA แม้ว่า ELISA สามารถวัด ปริมาณของไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาได้แต่ต้องระวังว่าไซโตไคน์ดังกล่าวอาจถูกใช้โดยเซลล์อื่น ได้ และไซโตไคน์ที่วัดได้เป็นค่ารวมของเซลล์ทั้งหมดจึงต้องอาศัยการแยกเซลล์ให้เป็นกลุ่มที่จำเพาะ ก่อนศึกษา อย่างไรก็ตามวิธีย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์แล้วพบว่ามีสัดส่วนอยู่ในเซลล์กลุ่มใดไม่ได้ หมายความว่าสารดังกล่าวจะต้องหลั่งออกมาภายนอกเสมอ in vivo หรือเป็นสารที่ไปปฏิบัติการใน ร่างกายจริงเนื่องจากการตรวจทำให้เซลล์ที่ผ่านการ fixation ซึ่งเป็นเซลล์ที่ตายแล้ว และเป็นการมอง ผลที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น (snapshot, static view) สัดส่วนของเซลล์ที่สร้างยังไม่ได้หมายถึง ความสำคัญของผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง สารที่ express ในสัดส่วนที่น้อยอาจให้ผลตอบสนองที่แรง มากได้ วิธีการตรวจไซโตไคน์ด้วยเทคนิค ELISA จึงมีความจำเพาะมากกว่า การนำ Flow cytometry มาใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบันทำให้มีข้อมูลของเซลล์ทั้งในแง่การเรียนรู้ต้นกำเนิดเซลล์ การเจริญ ของเซลล์ใน lineages ต่าง และในแง่การทำงาน ประสานสัมพันธ์ของเซลล์ในกลุ่มต่าง ๆ จึงนำไปสู่อ องค์ความรู้ในด้านพยาธิกำเนิดของโรคในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อความเข้าใจและการดูแลรักษาที่ เหมาะสมต่อไป

บทที่ 4

วัสดุและวิธีการ

4.1 ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

ประชากรเป้าหมาย ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีอาการหรือการติดเชื้อเรื้อรังอื่น และประชากรสุขภาพดีทั่วไป

ประชากรตัวอย่าง ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มาตรวจสุขภาพที่หอผู้ป่วยนอกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และคลินิกนิรนาม สภากาชาดไทย และผู้บริจาคเลือดที่สภากาชาดไทยซึ่งมีสุขภาพดีและไม่ติดเชื้อเอชไอวี

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา (Inclusion Criteria)

1. กลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งวินิจฉัยด้วยผลบวจากการตรวจการติดเชื้อทางน้ำเหลือง เช่น Latex particles agglutination test, ELISA หรือ Western Blot (WB) อย่างใดอย่างหนึ่ง 2 ครั้ง
 2. กลุ่มควบคุมคือ ผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง (ระดับเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลอยู่ในระดับปกติ) ให้เป็นกลุ่ม negative control
- โดยทั้งสองกลุ่มต้องมีคุณสมบัติ ดังกล่าวนี้ในการเข้าร่วมโครงการ:
- อายุตั้งแต่ 20 – 60 ปี
 - ยินดียินยอมเข้าร่วมโครงการโดยลงชื่อไว้ในเอกสาร consent form
 - ผลตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ ต้องมีระดับฮีโมโกลบินมากกว่า 10 กรัมต่อเดซิลิตร, คำนับเม็ดเลือด eosinophil น้อยกว่า 500 ตัวต่อซีซี

กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

- มีภาวะติดเชื้อเรื้อรังอื่น เช่น วัณโรค เชื้อราในช่องปาก ภายในช่วง 1 ปีก่อนและขณะที่เข้าร่วมการศึกษา
- ต้องไม่มีไข้หรืออาการ อาการแสดงที่บ่งชี้ถึงภาวะติดเชื้ออื่นใดขณะเข้าร่วมโครงการอย่างน้อยภายในช่วง 1 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมโครงการ
- มีโรคเรื้อรังที่รุนแรงอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น โรคตับอักเสบ โรคไตวายเรื้อรัง ภาวะหัวใจวาย

- มีประวัติกินยาสเตียรอยด์หรือยากดภูมิคุ้มกันหรือยาอื่นที่มีรายงานว่ามึผลต่อการทำงานของนิวโทรฟิลในช่วง 3 เดือนก่อนเข้าร่วมการศึกษา
- สำหรับเพศหญิงซึ่งกำลังตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- เข้าร่วมโครงการวิจัยอื่นที่จะได้รับยาหรือวัคซีนทดลองซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของอาสาสมัครอย่างน้อยในช่วง 4 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการศึกษานี้

4.2 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

สูตรการคำนวณจำนวนตัวอย่างสำหรับ Unmatched case-control study โดย Schlesselman

$$\text{จำนวน } n \text{ ต่อกลุ่มตัวอย่าง} = \frac{[Z_{\alpha} \sqrt{2P_0(1-P_0)} + Z_{\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)}]^2}{[P_2 - P_1]^2}$$

โดยค่า P2 = สัดส่วนของการแสดง IL-17 ภายในเซลล์ของกลุ่มตัวอย่างปกติ
= 0.625(115)

P1 คิดจากการประมาณว่า ให้มีความแตกต่างกันประมาณร้อยละ 50

ถ้าคาดว่า P1 น่าจะมีค่าต่ำกว่า P2 ดังนั้น P1 = 0.3125

$$P_0 = (P_1 + P_2) / 2 = 0.46875$$

$$Z_{\alpha} = 1.96 \text{ ที่ความเชื่อมั่น } 95\% \text{ หรือ } \alpha = 0.05$$

$$Z_{\beta} = 0.84 \text{ เมื่อให้มี power ในการแยกความแตกต่างไว้ร้อยละ } 80$$

แทนค่าได้ n เท่ากับ

$$\frac{[1.96 \sqrt{2(0.46875)(0.53125)} + 0.84 \sqrt{(0.3125)(0.6875) + (0.625)(0.375)}]^2}{[0.3125]^2}$$

จำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่มควรเป็น 38.8 = 39 ราย

การสังเกตและการวัด (Observation & Measurement)

■ ตัวแปรในการวิจัยนี้

ตัวแปรตาม (Dependent Variable) คือ ร้อยละของ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells ซึ่งได้รับการตรวจด้วย Flow cytometry ตัวแปรจะใช้มาตราการวัดแบบค่าที่แท้จริง (Ratio Scale) โดยเครื่องจะนับเซลล์โดยวัดความเข้มของสี fluorescence ที่จับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ IL-17

ภายในเซลล์ และ surface markers อันได้แก่ CD3 และ CD4 แล้วแสดงเป็น scatter diagram หน่วยจะระบุเป็นร้อยละของเซลล์ CD4+ T cells ที่ติดสีเชื่อมต่อ IL-17 ภายในเซลล์ (IL-17 expressing CD4+ T cells)

ตัวแปรอิสระ (Independent Variable) คือ การกระตุ้นเซลล์ในหลอดทดลองด้วยไมโตเจน ซึ่งในการศึกษานี้คือ PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) และ Ionomycin (PMA/I), ภาวะภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ซึ่งปกติในอาสาสมัครสุขภาพดี และบกพร่องในผู้ติดเชื้อเอชไอวี, จำนวนเซลล์ CD4+ T cells ของผู้เข้าร่วมโครงการ

ตัวแปรที่ไม่ต้องการ (Confounding Factors) ได้แก่ ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผล IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น เช่น ภาวะอักเสบเฉียบพลันในร่างกาย จาก การติดเชื้อ รวมไปถึงการติดเชื้อเรื้อรังในช่วง 1 ปีก่อนเข้าร่วมโครงการ, โรค autoimmune diseases, มะเร็ง, ภาวะ eosinophilia, ยาที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกันในร่างกาย เป็นต้น ซึ่งสามารถควบคุมได้ด้วยเงื่อนไขในการเข้าร่วมโครงการที่แสดงไว้ใน Inclusion และ Exclusion Criteria ร่วมกับการใช้แบบสอบถาม ซักประวัติ ตรวจร่างกายผู้เข้าร่วมโครงการ

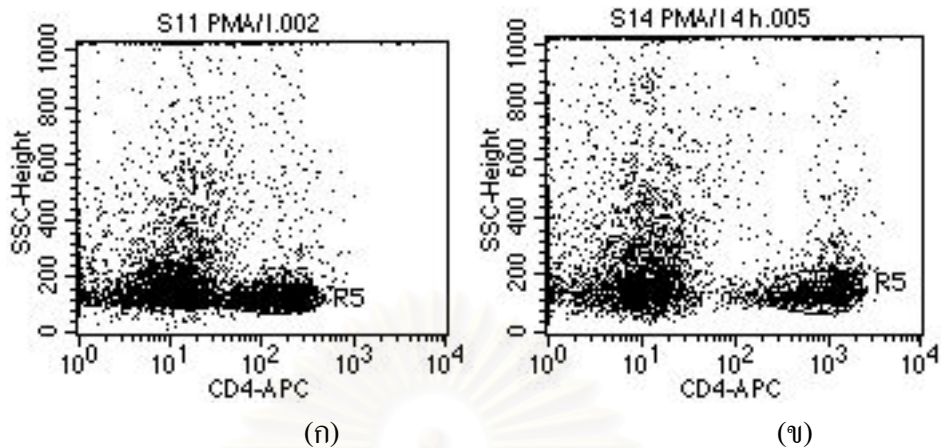
▪ ข้อตกลงเบื้องต้น

ผู้ติดเชื้อเอชไอวี การพิจารณาว่าติดเชื้อเอชไอวี อาศัยผลการตรวจทางน้ำเหลืองระบุให้ผลบวกด้วยวิธีการตรวจ Latex agglutination, ELISA หรือ WB อย่างใดอย่างหนึ่งอย่างน้อย 2 ครั้ง ผู้เข้าร่วมโครงการทุกรายต้องไม่มีอาการป่วยหรือ asymptomatic HIV infection โดยการประเมินทางคลินิก หลังจากเข้าร่วมโครงการแล้ว

อาสาสมัครสุขภาพดี หากไม่มีประวัติการเจ็บป่วยเรื้อรังหรือโรคประจำตัวที่ต้องทานยาซึ่งอาจมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน ร่วมกับการประเมินทางคลินิกที่อยู่ในเกณฑ์ปกติให้ถือว่าเป็นอาสาสมัครสุขภาพดี

▪ เครื่องมือที่ใช้ในการวัดตัวแปร

Intracellular Cytokine Staining Technique อาศัยขั้นตอนและวัสดุอุปกรณ์ที่ระบุไว้ใน Standard Operating Procedure (SOP) ของห้องปฏิบัติการ Vaccine and Cellular Immunology (VCI) Laboratory ของหน่วยภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันวิทยาทางคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ร่วมกับการปรับเปลี่ยนลำดับขั้นตอนของการย้อม surface markers ก่อนการ fixation เซลล์ เนื่องจากพบว่า surface marker โดยเฉพาะ CD4 จะถูก downregulation จากการถูกทำลายด้วยน้ำยา formaldehyde ที่ได้กล่าวไว้ในบทที่แล้วและแสดงให้เห็นดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดง Scatter Diagram ของ Flow Cytometry เพื่อนับเซลล์ทีเซลล์ CD4 บนผิว เซลล์ (CD4+ T cells)

ก. การเกิด downregulation ของ CD4 marker บนผิวเซลล์ เมื่อข้อมหลัง fix เซลล์ จะเห็นว่ากลุ่มเซลล์ทางด้านขวามือเข้ามาชิดกับกลุ่มเซลล์ทางด้านซ้ายมาก

ข. ภาวะ downregulation ของ CD4 marker ลดลงถ้าข้อมสี CD4 ก่อน fixation

สำหรับ SOP แสดงเทคนิคและขั้นตอนการข้อมไซโตไคน์ IL-17 ภายในเซลล์ ที่ใช้ในการศึกษานี้มีรายละเอียดดังนี้

ตัวอย่างเลือด เลือดที่เจาะมาจากอาสาสมัครปริมาณ 10-15 ซีซีเก็บไว้ในหลอดทดลองปลอดเชื้อที่บรรจุสารเฮปารินป้องกันการแข็งตัว สามารถทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ไม่เกิน 6 ชั่วโมงเพื่อนำสู่ขั้นตอนการแยกเซลล์

วัสดุอุปกรณ์

สาร Ficoll-Hypaque 10 mL

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 และ Fetal Bovine Serum (FBS)

Wash buffer เตรียมจาก PBS with 0.5% BSA, และ 0.1% Sodium Azide (NaN₃)

อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี L-glutamine, PGS, Streptomycin

Fixing solution (1% และ 4% PFA in PBS)

FACS Permeabilizing solution with saponin

สี Trypan Blue สำหรับข้อมเซลล์

Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (Sigma Cat.No.P-8139) เตรียม Conc. 25 µg/mL

Ionomycin (I) (Sigma Cat.No.I-0634) Conc. 10 µg/mL

Brefeldin A (BFA) (Sigma Cat.No.B-7651) เข้มข้น 250 µg/mL

Stimulated antigens: Tetanus toxoid (TT) Lot NO430 Conc. 0.25 µg/mL (>80 IU/mL)

PPD (Thai Red Cross) Lot I39 Conc. 10 µg/mL (100 IU/mL)

Standardized mite (D. pteronyssinus) Lot GB70-66B-12UR5,GRIA

: protein purity (chromatography) 2512 µg/10,000 AU/mL

Surface markers: CD3 (Per CP) (BD Cat.No.347344)

CD4 (APC)(BD Cat.No.340443)

Intracellular cytokines: IFN-gamma (PE) (BD Cat.No.340452)

IL-4(PE) (BD Cat.No.340451)

Rabbit anti Human IL-17 (Chemicon Cat.No.AB1472P)

Goat anti rabbit IgG (FITC) (Chemicon Cat.No.AP307F)

ขั้นตอนการเตรียมเลือดเพื่อแยก PBMC

1. ใช้เทคนิค over layer เลือด fresh heparinized venous blood บนสาร Ficoll-Hypaque ปริมาณ 4 mL ในหลอดทดลอง สัดส่วนของเลือดต่อ Ficoll คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 5:2
2. centrifuge ที่ 2,200x RPM เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เม็ดเลือดแยกตัว เป็น 4 ชั้นเรียงจากบนลงล่างคือ พลาสมา PBMC Ficoll และ เม็ดเลือดแดงตกตะกอน ตามลำดับ ให้ดูดส่วน plasma ที่แยกเฉพาะส่วนกลางที่มีเม็ดเลือดขาว PBMC ออก
3. ปั่นล้างด้วย RPMI ในสัดส่วนประมาณ 1:1 2 ครั้งด้วยความเร็ว 2,000x RPM และ 1,800x RPM ตามลำดับ เป็นเวลาครั้งละ 10 นาที แล้วเท supernatant ที่
4. นับเซลล์ PBMC ด้วยสี trypan blue โดยผสมสัดส่วนต่อสีประมาณ 20:1 ด้วย counting chamber ผ่านกล้องจุลทรรศน์
สูตรคำนวณหาจำนวนเซลล์ PBMC ต่อ mL โดยใช้ counting chamber
$$= X/4 \times \text{dilution factor} \times 10000 \times \text{ปริมาตร mL ของ RPMI ที่ใช้ผสมใน solution ที่นำมาใช้}$$
5. เจือจางปริมาณเซลล์ PBMC ที่ต้องการโดยใช้ RPMI + 10% FBS (R-10: อาหารเลี้ยงเชื้อ) เพื่อเลี้ยงเซลล์ใน incubator ด้วย ความเข้มข้น 1 ล้านเซลล์ต่อ mL ต่อ well
6. เก็บเซลล์ไว้ใน culture media ที่มี L-glutamine (R-10) โดยแบ่งเซลล์ใน 24 well plate ปริมาณ 1 mL ต่อหลุมไว้ใน incubator ที่มี 5% CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมกระตุ้นต่อไป

ขั้นตอนการเตรียม PBMC สำหรับการกระตุ้นด้วย mitogen หรือ แอนติเจน

เซลล์ PBMC ที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว ซึ่งเข้มข้นประมาณ 1 ล้านเซลล์ต่อ mL ของ R10 สามารถเก็บไว้ใน incubator อุณหภูมิ 37°C (5%CO₂) ไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง ก่อนเริ่มกระตุ้นด้วย PMA และ Ionomycin ความเข้มข้นซึ่งระบุไว้ใน protocol ปริมาณ 12.5 µL และ 40 µL ตามลำดับ ที่ใช้นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้ 5% CO₂ โดยมีเซลล์ในหลุมที่จัดให้เป็น control negative (ไม่ได้ใส่ PMA/I) และใส่ BFA ปริมาณ 40 µL ต่อ ซีซีทุกหลุม เพื่อให้ยับยั้งการหลั่งของ intracellular cytokines ออกนอกเซลล์ (ไม่ควรนานเกิน 5 ชั่วโมงเนื่องจาก BFA มีพิษต่อเซลล์)

ขั้นตอนการทำ ICCS

เซลล์ PBMC ที่ผ่านการกระตุ้นและ block ด้วย BFA นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,500x นาน 5 นาที ให้ตกตะกอน ที่ supernatant ก่อนนำ 0.02% EDTA ปริมาณ 50 µL ใส่ และ incubate ใน incubator ที่มี 5% CO₂ นาน 10 นาที หลังจากนั้นปั่นล้างด้วย washing buffer ครั้งละ 2 mL ด้วยความเร็ว 1,500x นาน 5 นาที หลังจากนั้น supernatant แล้วให้ย้อม surface markers ก่อนด้วย CD3-PerCP และ CD4-APC mixed solution (4:1) ปริมาณ 3 µL (ถ้ามีปริมาณมากกว่า 0.1 ซีซี ให้ปั่นให้เซลล์ตกตะกอนก่อนด้วยความเร็ว 1,500 x นาน 10 นาที) เก็บไว้ใน incubator อุณหภูมิ 37°C (5%CO₂) นาน 20 นาที

การ Fixed cell ให้คงรูปทรงกลม ใช้ 4% paraformaldehyde (4%PFA) 300 µL นาน 10 นาที ใน incubator 37° C ปั่นล้างด้วย washing buffer 2 mL ด้วยความเร็ว 1,500x นาน 5 นาที

การเจาะรูเซลล์จะใช้สาร FACS-Per 1X 300 µL เป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นปั่นล้างด้วย buffer ความเร็ว 1500 x เป็นเวลา 5 นาที นำไปย้อมด้วย MAbs ของ cytokines ที่ต้องการศึกษาภายในเซลล์ ซึ่งได้แก่ IL-17 , IFN-gamma ที่ติดสี Fluorescence ปริมาณ 1 และ 3 µL ตามลำดับ ที่ไว้อย่างน้อย 30 นาทีในที่เย็น (4° C) และ ตามด้วย Goat anti rabbit IgG ติดสี FITC ซึ่งจำเพาะต่อ anti- IL-17 นาน 30 นาทีเก็บไว้ในที่มืดและเย็น อย่างน้อย 30 นาที เมื่อปั่นล้างด้วย buffer ครั้งสุดท้าย แล้วให้ fixed cell ที่ย้อมไว้แล้วด้วย 1% PFA 500 µL เก็บไว้ในตู้เย็น (หุ้มด้วย foil aluminium) ได้ภายใน 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาตรวจนับเซลล์ที่ติดสีเรืองแสงที่ย้อมไว้และแสดงร้อยละของการติดสีด้วยเครื่อง Flow cytometry ต่อไป

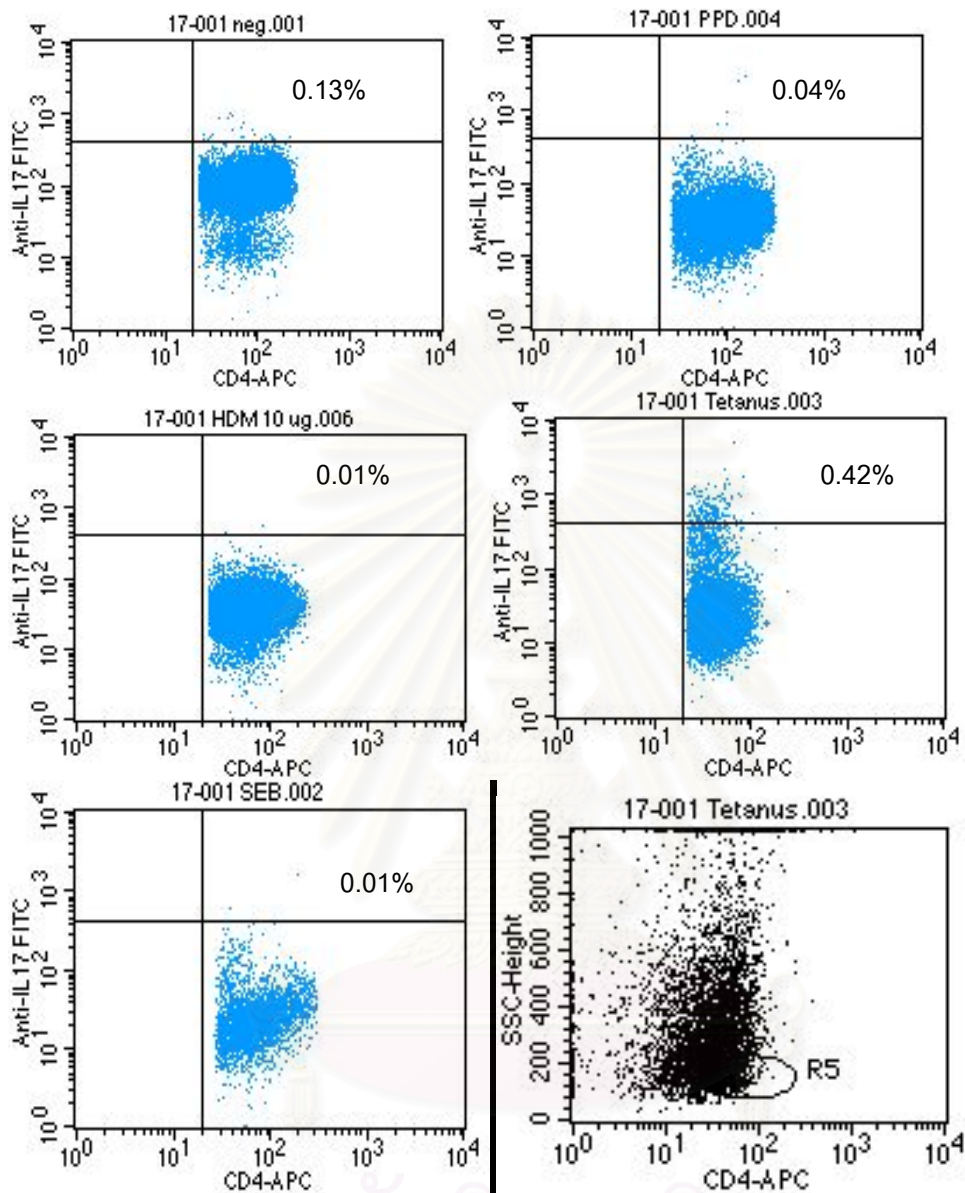
การกระตุ้นด้วยแอนติเจนต่าง ๆ (Specific Antigens)

ในช่วงแรกของการศึกษาวิจัยได้วางแผนการศึกษาการตอบสนองของ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells โดยเลือกแอนติเจนที่จำเพาะต่อกลุ่มเซลล์ต่าง ๆ ไว้ ได้แก่ แอนติเจนที่กระตุ้น Th0 (TT 0.25 µg/mL) , แอนติเจนที่กระตุ้น Th1 (PPD จาก Mycobacterium tuberculosis 10 µg/mL), แอนติเจนที่กระตุ้น Th2 (dust mite) และแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อ HIV-1 (Gag Env และ

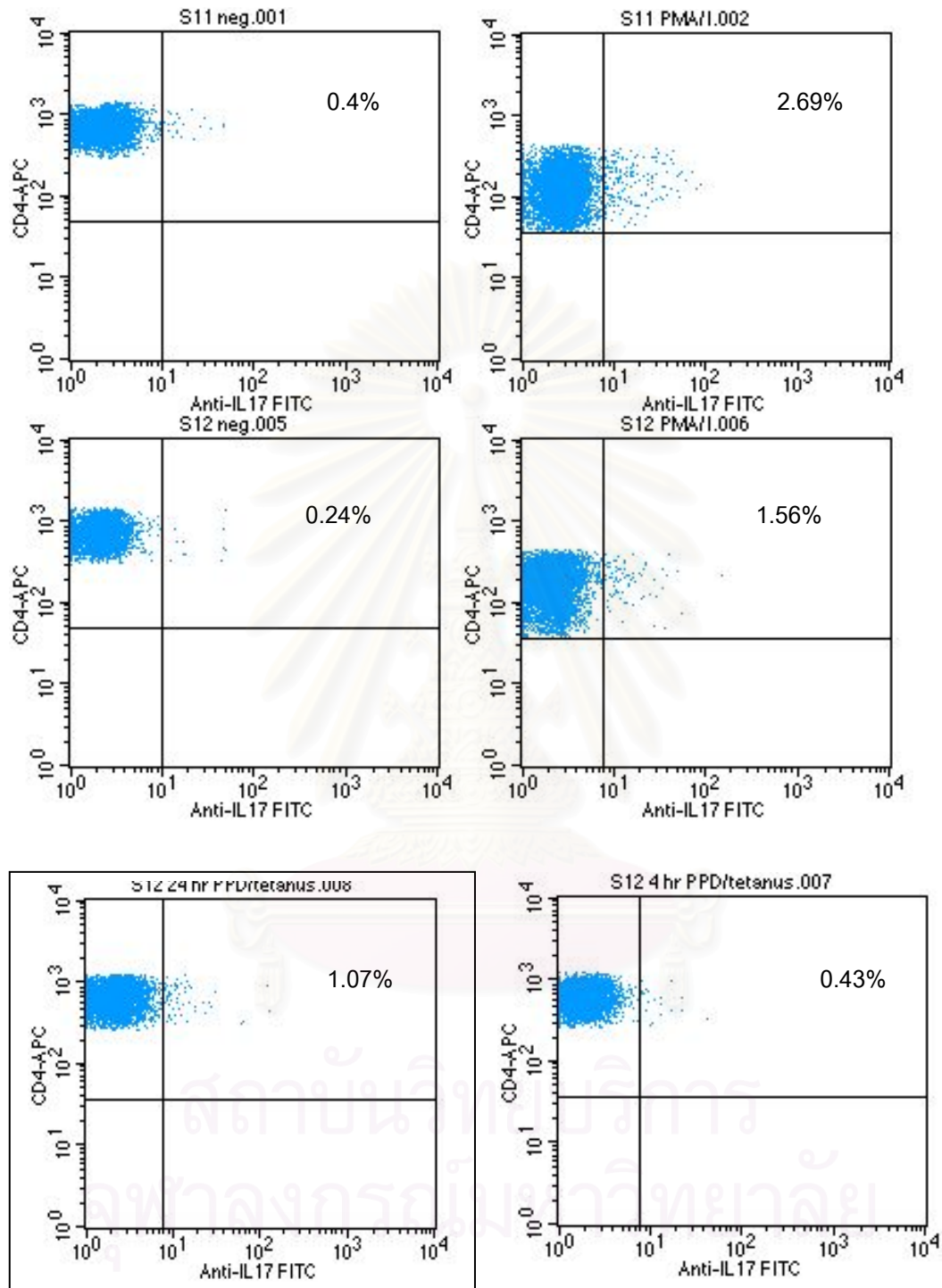
Pol recombinant protein รวมกันโดยแต่ละแอนติเจนใช้ขนาด 5 PFU/cell) อย่างไรก็ตามในช่วงเตรียม SOP ได้เริ่มศึกษาการตอบสนองต่อ TT, PPD และ dust mite ไว้ในกลุ่มอาสาสมัครซึ่งมีประวัติได้รับวัคซีนบาดทะยักและวัณโรคมามาก่อนร่วมกับมีประวัติภูมิแพ้ต่อไรฝุ่นจากผล skin prick test ทางผิวหนัง เทียบกับ Staphylococcal enterotoxin B (SEB) จากการวัด flow cytometry หลังกระตุ้นให้ผลดังรูปที่ 8 จากรูปจะเห็นว่า Tetanus toxoid (TT) น่าจะเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมในการกระตุ้น CD4+ T cells เพื่อดู IL-17 expression เนื่องจากให้ผลดีที่สุด ส่วนแอนติเจนอื่นที่เหลือนั้นให้ผลไม่ดี นอกจากนี้ยังพบปรากฏการณ์ที่ surface marker อย่าง CD4 เกิดภาวะ downregulation หลังกระตุ้นซึ่งแสดงตัวอย่างใน scatter diagram รูปที่ 8 (ล่างขวาสุด)

จากผลดังกล่าว เมื่อพิจารณาแล้วพบว่า ขนาดที่ใช้ในกระตุ้นไม่น่าจะเป็น dose ของแอนติเจนที่เหมาะสมหรือต้องใช้เทคนิคอื่นเพิ่มเติมสำหรับการกระตุ้นให้สร้าง IL-17 ในเซลล์ CD4 T cells แม้ว่า TT จะให้ผลที่ดีที่สุดแต่อัตราการแสดง IL-17 ไม่ได้เพิ่มสูงมากนัก ร่วมกับการเกิดภาวะ downregulation ของ CD4 markers ซึ่งจะมีผลต่อการเลือกกลุ่มเซลล์ไปนั้นนั้นจะทำได้ไม่ดี และพบเซลล์ตายจำนวนมากหลังกระตุ้นด้วย TT ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป สาเหตุอาจเกิดจากระบบการกระตุ้นอาจไม่เหมาะสมและไม่เหมือนในธรรมชาติ ซึ่งต้องมีจำนวน antigen presenting cells ที่เหมาะสมในกระตุ้น CD4 T cells และ เกิดสัญญาณที่ 2 (costimulatory molecules) เพื่อให้สามารถกระตุ้นเซลล์ให้สร้างไซโตไคน์ที่มากพอ ซึ่งคงต้องพิสูจน์ต่อโดยการแยก APC มา co-culture ร่วมและ ใช้ anti CD28 การเตรียมขั้นตอนและเทคนิคการกระตุ้นและย้อมเพื่อลดปัญหาดังกล่าวต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นมาก และยังคงเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมของแอนติเจนแต่ละตัวอีกด้วย ทำให้ผู้วิจัยตัดสินใจเลือกสาร PMA/Ionomycin เพียงตัวเดียวในการกระตุ้นเซลล์ CD4 T cells ซึ่งต่อมาพบว่าเกิดการตอบสนองต่อ IL-17 expression ได้ดีขึ้นกว่าเดิมดังแสดงในรูปที่ 9 จากรูปจะเห็นว่าอาสาสมัครทั้งสองคนให้ผลการ IL-17 expression หลังกระตุ้นด้วย PMA/I ที่ 4 ชั่วโมงได้เท่าเทียมกับการกระตุ้นด้วย PPD/Tetanus ที่ 24 ชั่วโมง

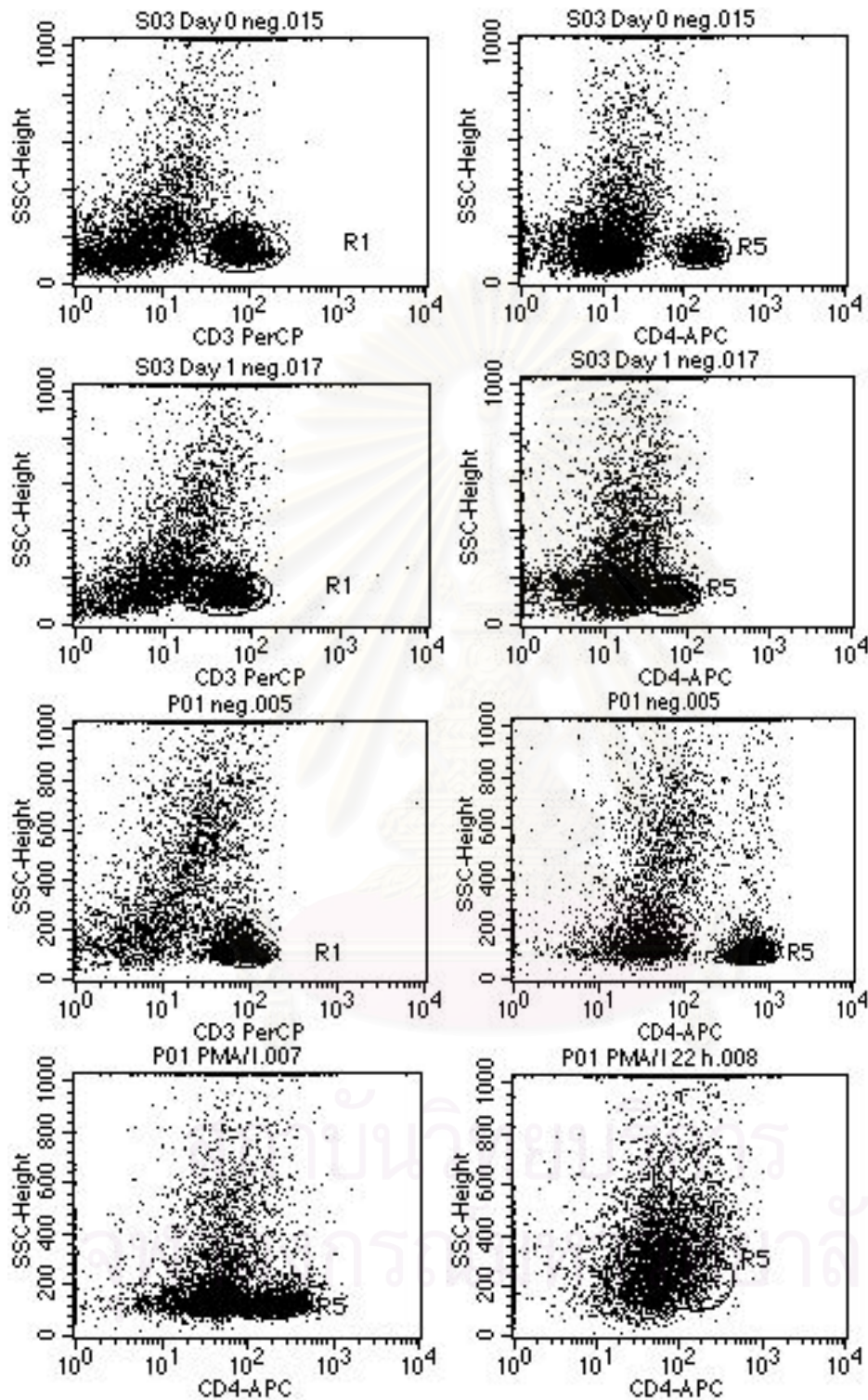
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 แสดง Scatter Diagram ของ IL-17 Expression (Right upper quadrant) ต่อการตอบสนองด้วยแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ TT, PPD, HDM, SEB โดยมีเซลล์ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นเป็น Negative control (รูปซ้ายบน) สำหรับรูปล่างขวาสุดแสดง ปรากฏการณ์การรวมกลุ่ม CD4 downregulation หลังการกระตุ้นด้วย tetanus toxoid (TT) จะเห็นว่าเซลล์ไม่สามารถแยกกลุ่มเป็นกลุ่มที่ติด CD4 surface marker ได้อย่างชัดเจน



รูปที่ 9 แสดง Scatter Diagram ของ IL-17 Expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells (Right upper quadrant) หลังกระตุ้นด้วย PMA/I หรือ PPD/TT เทียบกับไม่ผ่านการกระตุ้น (negative control) จากภาพจะเห็นว่าตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร 2 ราย (S11,S12) ให้ผลตอบสนองต่อ PMA/I ที่ 4 ชั่วโมง ได้ทัดเทียมกับ PPD/TT ที่เวลา 24 ชั่วโมง (รูปต่างซ้าย)



รูปที่ 10 แสดงตัวอย่างการเกิด Downregulation ของ CD4 Surface Marker เมื่อกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin จะเห็นได้ว่าเมื่อไม่ได้กระตุ้น (negative) ดังรูปบนสุดซ้ายจะเห็นกลุ่มเซลล์ทางด้านขวามือชัดเจน เซลล์ดังกล่าวคือ CD3+ cells ขณะที่เซลล์รูปบนสุดขวา คือเซลล์ CD4+T cells กลุ่ม

เซลล์จะแยกออกเป็นกลุ่มทางด้านขวาเนื่องจากติดสีต่อ antiCD3 หรือ antiCD4 จากการย้อม และเริ่มเกิดการรวมกลุ่มกันเมื่อทิ้งไว้ 1 วัน โดยไม่ได้กระตุ้นเซลล์และกระตุ้นด้วย PMA/I ที่ 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

การเลือกเวลาในการกระตุ้นที่เหมาะสม

จากการศึกษาของ Lanarczyk และคณะ (115) พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์ให้ express IL-17 ด้วย ICCS น่าจะอยู่ภายใน 48 ชั่วโมงแต่ยังพบข้อมูลที่ไม่สอดคล้องกันของการตรวจ mRNA ของ IL-17 ภายในเซลล์และไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ซึ่งสามารถตรวจพบได้ถึง 7 วัน การศึกษานี้ใช้เวลาในการกระตุ้นตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไปจึงทำให้ไม่มีข้อมูลในช่วง 48 ชั่วโมงแรก หลังกระตุ้น สำหรับแอนติเจนที่นำมาใช้ทั้งหมดแล้วพบว่า TT เป็นตัวเลือกที่เหมาะสมเนื่องจากกระตุ้นได้สัดส่วนของเซลล์ที่ตอบสนองสูงที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาขั้นตอนการศึกษาแล้วพบว่าไม่มีเทคนิคไม่เหมือนในการศึกษาอื่น กล่าวคือมีการนำ mitogen มากระตุ้นร่วมด้วยหลังจากกระตุ้นด้วยแอนติเจนในช่วงแรกแล้ว และยังสามารถนำ anti-CD3/antiCD28 มาใช้แยก activated T cells โดย cell sorter เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ที่นำมากระตุ้นเป็นเซลล์ T cells ที่พร้อมรับการตอบสนองต่อแอนติเจนด้วย

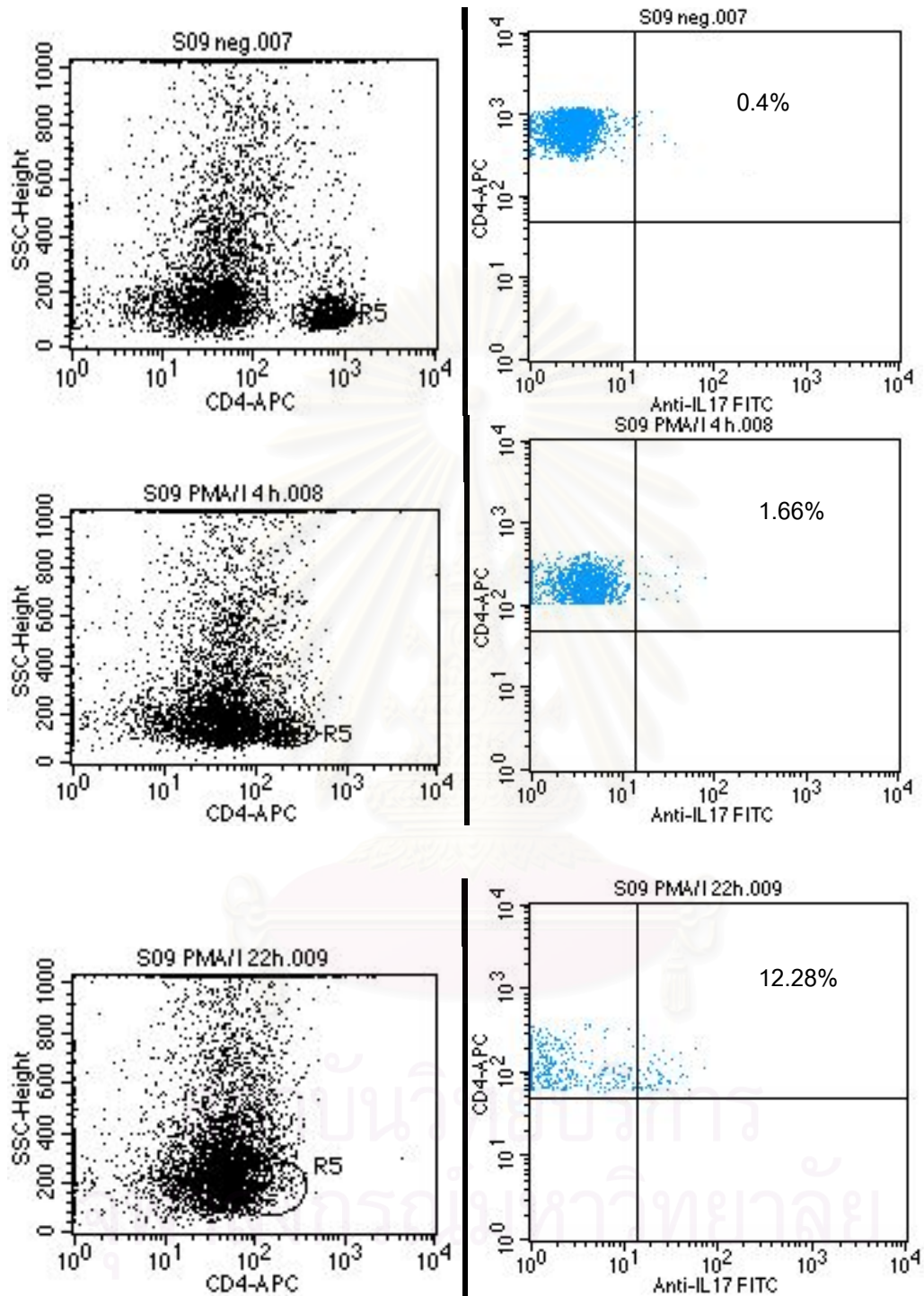
นอกจากการเลือกเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นเซลล์จะส่งผลต่อ IL-17 expression ให้ได้ผลดีและสูงพอเหมาะแล้วปรากฏการณ์เซลล์รวมกลุ่ม จาก marker downregulation ยังเป็นอีกปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงร่วมด้วย ตัวอย่างแสดงในรูปที่ 10 จะเห็นว่ามีปรากฏการณ์ downregulation ของ CD4 surface marker ไม่เท่ากันเมื่อกระตุ้นด้วย mitogen ที่เวลาต่างกัน อย่างไรก็ตามยังพบว่าเซลล์ที่แม้ไม่ได้ถูกกระตุ้นแต่ทิ้งไว้ 1 วันในอาหารเพาะเลี้ยงก็ยังพบว่า CD4 marker เข้ามารวมกลุ่มแล้วต่างจาก negative control แต่ยังไม่แยกกลุ่มเซลล์ที่มี CD4 positive ได้ เช่นเดียวกับเมื่อกระตุ้นด้วย PMA/I ที่ 4 ชั่วโมง แต่ในขณะที่เมื่อกระตุ้นนานขึ้นถึง 22 ชั่วโมง เซลล์ CD4 T cells จะเกิดการรวมกลุ่มกันอย่างมากจนไม่สามารถแยกเซลล์ที่ติดสีออกจากกลุ่มที่ติดสีอ่อนได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกรณีไม่ถูกกระตุ้น

สำหรับการศึกษานี้ได้นำแอนติเจน (PPD/TT) และ mitogen (PMA/I) มากระตุ้นที่เวลาต่าง ๆ 4, 24, 72, 168 ชั่วโมงพบว่า การกระตุ้นด้วย PPD/TT ที่ 24 ชั่วโมงสามารถให้ค่า expression ได้ดีที่สุด และเกิด downregulation ของ CD4 marker ไม่มากนัก เนื่องจากสัดส่วนเซลล์ที่ตายจะมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้นแต่เมื่อเทียบกับ PMA/I แล้วพบว่า PMA/I ให้ผลตอบสนองที่แรงกว่า โดยเมื่อใช้เวลาน้อยกว่าเพียง 4 ชั่วโมงสามารถกระตุ้นให้เกิด IL-17 expression จะสูงขึ้นในสัดส่วนที่เทียบกับการกระตุ้นด้วย PPD/TT ที่ 24 ชั่วโมงดังรูปที่ 9 ร่วมกับวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ต้องการจะ

เปรียบเทียบการตอบสนองในผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งเป็นกลุ่มคน ไข่ที่มีความผิดปกติของจำนวน CD4+ T cells ลดลงและมีคุณภาพด้อยกว่าประชากรปกติอยู่แล้ว จึงควรใช้ตัวกระตุ้นที่แรงไว้ก่อน ส่วนการใช้แอนติเจนที่จำเพาะแม้จะให้ข้อมูลที่ถูกต้องกว่าเนื่องจากให้สถานะที่เหมือนจริงกว่าและมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการกระตุ้นในร่างกายของคนไข่ ต่างจากการ mitogen ซึ่งเป็นสารเคมีซึ่งด้วยความเข้มข้นที่ใช้ในหลอดทดลองอาจมีผลเป็นพิษต่อร่างกายและไม่มีโอกาสเกิดขึ้นในความเป็นจริง แต่ผู้วิจัยตัดสินใจพิจารณาใช้ mitogen กระตุ้นแทน เนื่องจากข้อจำกัดที่เวลา และเทคนิคในการเตรียมการซึ่งต้องมีเพิ่มขึ้นอีกมากถ้าใช้แอนติเจนที่จำเพาะในการกระตุ้นเซลล์ CD4+ T cells สำหรับการศึกษาศึกษาโดยการกระตุ้นด้วยแอนติเจนที่จำเพาะซึ่งน่าจะให้ผลตรวจสอบหน้าที่ของ T cells ได้ดีและเฉพาะขึ้นนั้นน่าจะมีการศึกษาต่อไปโดยอาศัยผลศึกษาของ IL-17 expression ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีในครั้งนี้แล้ว

สำหรับเวลาที่ใช้กระตุ้นได้เลือกที่เวลา 4 ชั่วโมงในการกระตุ้นเท่านั้นเนื่องจากการกระตุ้นด้วย PMA/I นานถึง 24 ชั่วโมงจะให้ผล downregulation ของ CD4 marker อย่างมากและมีเซลล์ตายเป็นจำนวนมากซึ่งได้แสดงให้เห็นในตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดีดังรูปที่ 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงการเกิดปรากฏการณ์เซลล์ร่วมกลุ่ม (CD4 Downregulation) และเซลล์ตายเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย PMA/I นานถึง 24 ชั่วโมงดังแสดงในรูปข้างสุด

การตรวจ IL-17: เลือดจากผู้เข้าร่วมโครงการทุกคนจะนำมาผ่านขั้นตอนในการแยกเม็ดเลือดขาวชนิด peripheral mononuclear cells (PBMC) เพื่อกระตุ้นและย้อม marker ที่ผิวเซลล์และภายในเซลล์ก่อนนำไปตรวจ flow cytometry เพื่อนับร้อยละของเซลล์ที่ express IL-17 เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย mitogen ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ผลการตรวจมีหน่วยเป็นร้อยละของเซลล์ที่แสดง IL-17 ซึ่งตัวแทนในแต่ละกลุ่มซึ่งได้แก่ เซลล์ที่ผ่านและไม่ผ่านการกระตุ้นด้วย mitogens ของทั้งผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี จะใช้ค่ามัธยฐาน (median) เนื่องจากได้ทดสอบแล้วพบว่า การกระจายตัวของข้อมูลไม่ใช่การกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) นำค่ามัธยฐานของแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบกัน และพิจารณาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับตัวแปรของแต่ละกลุ่มโดยเฉพาะระดับ CD4 ที่แตกต่างกันด้วย เนื่องจากสมมติฐานของการศึกษาคาดว่าระดับ CD4 น่าจะมีผลต่อ expression ของ IL-17 ในหลอดทดลอง

เนื่องจากขั้นตอนและเทคนิคของการเตรียมเซลล์ PBMC การกระตุ้นเซลล์ การย้อมสี การใช้เครื่อง flow cytometry ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อนจึงต้องอาศัยการฝึกฝนและความเชี่ยวชาญของการปฏิบัติงานในห้องแล็บ จึงต้องใช้เวลาในการเตรียม protocol และทักษะเพื่อให้ไม่เกิด intra-individual variability จำนวนผู้รับผิดชอบในการศึกษาในห้องปฏิบัติการครั้งนี้มีเพียง 2 คนซึ่งรับผิดชอบหน้าที่คนละส่วน จึงลดปัญหาการเกิด inter-individual variability สำหรับขั้นตอนการ blind แม้ไม่สามารถทำได้เต็มที่เนื่องจากมีการเขียนฉลากติดที่หลอดทดลองแต่ผู้วิจัยได้ตั้งระบบการทำงานให้ทุกหลอดในแต่ละชุดซึ่งมีทั้งเลือดและเซลล์ PBMC ของทั้งอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีผ่านขั้นตอนในแต่ละขั้นตอนพร้อม ๆ กันไม่มีการแบ่งแยกว่าเป็นเลือดจากอาสาสมัครในกลุ่มไหน ส่วนการใช้เครื่อง flow cytometry อาศัยการตั้งระบบตั้งแต่ในช่วงการฝึกทักษะในการปฏิบัติงานจนได้ค่ามาตรฐานของเครื่องในระบบที่ตั้งไว้ เมื่อถึงเวลาใช้ตัวอย่างเลือดจริง คอมพิวเตอร์จะวัดการ expression ของไซโตไคน์และ surface markers อย่างอัตโนมัติ โดยผู้ใช้เครื่องไม่ได้ตั้งระบบใหม่

4.3 วิธีการ หรือ สิ่งแทรกแซง (Intervention)

- ผู้วิจัยอธิบายหลักการและเหตุผลของการทำการศึกษา ขั้นตอนการศึกษาวิจัย ประโยชน์และความเสี่ยงของการเข้าร่วมโครงการ ตอบข้อซักถามแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ หลังจากนั้นผู้เข้าร่วมการศึกษาลงนามในหนังสือยินยอมยินดีเข้าร่วมการวิจัย
- เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณข้อพับแขน ปริมาณ ไม่เกิน 30 ซีซี ครั้งเดียวซึ่งถ้าเป็นอาสาสมัครสุขภาพดีที่มาเจาะเลือดที่สถานพยาบาลไทย ย่อมไม่มีความเสี่ยงเพิ่มจากการเจาะเลือดในครั้งเดียวกัน

4.4 การรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลทาง demographic และ clinical data เช่น ประวัติความเจ็บป่วย การติดเชื้อในอดีต เป็นต้น ซึ่งได้จากการซักประวัติและตรวจร่างกาย จะบันทึกลงใน source document เมื่อได้ข้อมูลเพิ่มเติมจากผลการตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการ การตรวจ IL-17 ในหลอดทดลอง ของคนไข้หรืออาสาสมัครสุขภาพดี จึงรวบรวมเก็บลงใน แบบบันทึกข้อมูล (case record form) สำหรับผู้เข้าร่วมการศึกษาในแต่ละรายซึ่งจะถูกแปลงข้อมูลให้เป็นกลุ่มหรือตัวเลขเพื่อสะดวกสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล หลังจากนั้นข้อมูลทั้งหมดจะนำเข้าสู่ระบบคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5 ต่อไปเพื่อนำไปหาค่ามัธยฐานและวิเคราะห์ทางสถิติที่เหมาะสม

4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทาง demographic ซึ่งเป็นข้อมูลในเชิงคุณภาพ เช่น เพศ อาชีพ การศึกษา จะนำมาหาสัดส่วนคิดร้อยละและแสดงเป็นข้อมูลเชิงบรรยาย สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณ เช่น อายุ จะนำมาหาค่าเฉลี่ย ความแปรปรวน เพื่อแสดงเป็นข้อมูลเชิงบรรยายให้เห็นลักษณะของประชากรที่นำมาศึกษาในแต่ละกลุ่ม ส่วนข้อมูลอื่น ๆ ที่ได้จากแบบสอบถามและการตรวจร่างกาย เช่น ประวัติการสัมผัสแอนติเจนชนิดต่าง ๆ, ประวัติการใช้ยา, ประวัติโรคประจำตัวในอดีต, ความผิดปกติของระบบต่าง ๆ ในร่างกาย เป็นต้นนั้นจะนำไปใช้เป็นคุณสมบัติในการคัดเลือกเข้าร่วมและคัดออกจากโครงการ และการเตรียมแอนติเจนเพื่อนำมากระตุ้น และอภิปรายผลการศึกษา

ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการจากการตรวจเลือด เช่น การตรวจเม็ดเลือดสมบูรณ์ การตรวจหาระดับเม็ดเลือด CD4+ T cells การตรวจหาร้อยละของเซลล์ในการแสดงไซโตไคน์ภายในเซลล์ จากการกระตุ้น จะนำมาหาค่ามัธยฐานเพื่อใช้ในการแสดงเชิงบรรยายและเชิงวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มประชากรต่อไป สำหรับการตรวจอื่นที่ระบุในระเบียบวิจัย เช่น หน้าที่ของตับ หน้าที่ของไต เอกซเรย์ปอด เป็นต้น นำไปใช้เป็นคุณสมบัติในการคัดเลือกเข้าร่วมและคัดออกจากโครงการ

การพิจารณาข้อมูลในเชิงวิเคราะห์นั้นได้กำหนดการทดสอบไว้เป็นแบบสองทาง (two-tail test) โดยเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อ IL-17 expression ด้วยวิธี Chi-square method สำหรับข้อมูลที่เป็น qualitative data เช่น เพศ การศึกษา ภูมิภาค ความเสี่ยงในการติดเชื้อเอชไอวี เป็นต้น ส่วนข้อมูลที่เป็น quantitative data เช่น อายุ ระดับเม็ดเลือด CD4 cells, จำนวนเม็ดเลือด eosinophil ในเลือด, ระยะเวลาการติดเชื้อเอชไอวี, ระดับไวรัสในเลือด เป็นต้น ใช้วิธีเปรียบเทียบแบบ

nonparametric methods จากการตรวจสอบการแจกแจงของข้อมูลที่ได้ด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิธีของ Kolmogorov-Smirnov พบว่าตัวแปรหลักของการศึกษา ซึ่งได้แก่ IL-17 expression และ CD4 count นั้นแจกแจงแบบไม่ใช้ปกติ ($p=0.001$) ดังนั้นจึงใช้วิธี Mann-Whitney U test สำหรับการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี สำหรับการหาความสัมพันธ์ของข้อมูลจากเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นและไม่ผ่านการกระตุ้นในอาสาสมัครกลุ่มเดียวกันจะใช้วิธี Wilcoxon signed -rank test โดยกำหนดให้ค่า p value มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติที่จะแสดงความแตกต่างที่ทดสอบได้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับ CD4 และ IL-17 expression อาจพิจารณาจากความแตกต่างของ IL-17 expression ในแต่ละกลุ่มของ CD4+ T cell count ที่ต่างกันโดยแยกเป็น <200, 200-499 และ ตั้งแต่ 500 ตัวต่อซีซี ตามเกณฑ์การแบ่งระยะผู้ติดเชื้อเอชไอวีโดย CDC (revised classification system 1993) (MMWR 41:RR-17) ของประเทศสหรัฐอเมริกา หรือใช้วิธี Bivariate correlations โดย Pearson correlation เพื่อหาสหสัมพันธ์ของตัวแปรในเชิงอัตราส่วน (ratio) ซึ่งถ้าพบความสัมพันธ์ของตัวแปรดังกล่าวจึงนำมาหาสมการถดถอยโดยใช้วิธี Multiple Regression

4.6 ปัญหาทางจริยธรรม

ไม่มี เนื่องจากไม่มีการใช้ยาหรือสิ่งแทรกแซงให้แก่ผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรืออาสาสมัครสุขภาพดี อย่างไรก็ตามเนื่องจากต้องใช้เลือดของอาสาสมัคร ในแง่จริยธรรมของการศึกษาวิจัยที่ต้องใช้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะของมนุษย์จึงต้องได้รับหนังสือยินยอมเข้าร่วมโครงการเป็นลายลักษณ์อักษร (Informed consent) ก่อนเจาะเลือดเพื่อให้ผู้เข้าร่วมโครงการทราบหลักการและเหตุผลในการศึกษาลำดับขั้นตอนการตรวจ ประโยชน์และความเสี่ยงที่จะได้รับการเข้าร่วมโครงการ การวิจัยนี้ได้รับความเห็นชอบจาก คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการวิจัย

5.1 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรตัวอย่าง

จากการคัดกรองอาสาสมัครตั้งแต่เดือน กันยายน 2547 ถึง มกราคม 2548 มีผู้ยินดีเข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 98 คน แยกเป็นกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 51 คนและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 47 คน ผลตรวจเลือดทางห้องปฏิบัติการพบภาวะ eosinophilia (eosinophil count มากกว่า 500 ตัวต่อซีซี) จำนวน 10 คน โดยเป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี 6 คนและอาสาสมัครสุขภาพดี 4 คน ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีต้องคัดอาสาสมัครออกเนื่องจากตรวจพบว่าติดเชื้อฉวยโอกาสดังนี้ วัณโรคปอด 4 คน และ Isosporiasis 1 คน ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดียังต้องคัดออก 3 คน เนื่องจากปัญหาเทคนิคการย้อมไซโตไคน์ และไม่สามารถติดตามอาสาสมัครให้กลับมาเจาะเลือดซ้ำได้ เช่นเดียวกับอาสาสมัคร 2 คนในกลุ่มติดเชื้อเอชไอวีถูกคัดออกหลังตรวจสอบผลการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์แล้วพบว่ากลุ่มเซลล์ที่ย้อมติด surface CD4 marker มีจำนวนน้อยมาก ซึ่งเป็นผลมาจากภาวะ CD4 count ต่ำมาก (< 5 ตัวต่อซีซี) 1 คน และ ปัญหาเทคนิคการย้อม 1 คน ดังนั้นจึงเหลือประชากรตัวอย่างที่นำเลือดมาวิเคราะห์ทั้งสิ้นจำนวน 80 คน แยกเป็น ผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี กลุ่มละ 40 คน ซึ่งทั้งหมดผ่านเกณฑ์ในการคัดเลือกและคัดออก ไม่มีโรคเรื้อรัง ไม่ได้กินยาที่เป็นข้อห้ามของโครงการวิจัย และไม่ได้เข้าร่วมโครงการวิจัยอื่นที่มีการแทรกแซงและส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันพึ่งเซลล์ ยกเว้นยาต้านไวรัสเอดส์ จึงสามารถเข้าร่วมโครงการได้ทั้งหมด

ข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี ที่สำคัญได้แสดงและเปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 3 สำหรับผลทางห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ที่สำคัญในการคัดเลือกเข้าร่วมโครงการ เช่น หน้าทีของไต หน้าทีของตับ เอกซเรย์ปอด ซึ่งได้ระบุไว้ในระเบียบวิจัยแล้วนั้น ผลตรวจของผู้เข้าร่วมโครงการทุกคนอยู่ในเกณฑ์ปกติ จึงไม่ได้แสดงการเปรียบเทียบไว้

สำหรับกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีนั้นมีอายุเฉลี่ย (\pm SD) 29.68 ± 8.98 ปี อายุต่ำสุด 20 ปี อายุสูงสุด 51 ปี เพศชายและหญิงเท่ากัน ส่วนใหญ่จบการศึกษาในระดับปริญญาตรีหรือเทียบเท่าคิดเป็นร้อยละ 77.5 ระดับการศึกษาสูงสุดคือปริญญาโท 7 คน (17.5%) ที่อยู่ปัจจุบันเกือบทั้งหมดอาศัยอยู่ในกรุงเทพฯและปริมณฑลถึงร้อยละ 97.5 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งมีอายุเฉลี่ย 36.28 ± 9.05 ปี อายุต่ำสุด 20 ปี อายุสูงสุด 60 ปี แล้วพบว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีอายุเฉลี่ยสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.002$) การทดสอบความแตกต่างของอายุอาสาสมัครแต่ละกลุ่มสามารถ

เปรียบเทียบได้โดยใช้วิธี T test เนื่องจากการกระจายข้อมูลอายุเป็นแบบปกติและผลตรวจสอบโดย Leven's test for equality of variances พบว่า F test =0.172 (p = 0.68) สำหรับตัวแปรอื่นไม่ได้กระจายข้อมูลแบบปกติจึงต้องใช้การทดสอบโดยวิธี nonparametric ซึ่งแสดงค่า p-value ไว้ในตารางที่ 5 แม้ว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีร้อยละ 80 มีภูมิลำเนาปัจจุบันอยู่ในกรุงเทพและปริมณฑล ร้อยละ 57.5 ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีจบการศึกษาในระดับปริญญาตรีหรือเทียบเท่าขึ้นไป ระดับการศึกษาสูงสุดคือปริญญาโท 1 คน (2.5%) และส่วนใหญ่เป็นเพศชาย (ร้อยละ 60) แต่ไม่พบว่ามีแตกต่างจากกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อาสาสมัครสุขภาพดีที่เข้าร่วมโครงการส่วนใหญ่เป็นผู้บริจาคเลือดที่สภากาชาดไทย เลือดจากผู้บริจาคทุกถุงจะได้รับการตรวจ anti-HIV antibody ซึ่งเป็นมาตรฐานการตรวจสอบเลือดเพื่อป้องกันปัญหาการติดเชื้อผ่านการได้รับเลือด และเมื่อตรวจสอบผลเลือดการติดเชื้อเอชไอวีที่สภากาชาดไทยแล้วพบว่าอาสาสมัครสุขภาพดีทุกรายแสดงผลเลือดเป็นลบทั้งหมด

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลพื้นฐานของอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้าร่วมการศึกษา

Variables	Median (Min-Max)		P-value
	HIV	Healthy	
เพศชาย N (%)	20 (50%)	24 (60%)	0.369
ประวัติภูมิแพ้ N (%)	2 (5%)	3 (7.5%)	0.644
อายุ (ปี)	36 (20-60)	26 (20-51)	0.001*
Hb (g/dL)	13.3 (10.1-15.1)	12.75 (10.3-17.4)	0.405*
WBC (/mm ³)	5435 (2750-9040)	5120 (3160-8610)	0.744*
Neutrophils (/mm ³)	2692.5 (1276-6390)	2930 (1690-5680)	0.175*
Eosinophils (/mm ³)	160.5 (10-430)	138 (30-369)	0.577*
Platelet (x 10 ³ /mm ³)	229 (26-352)	215.5 (162-404)	0.931*
Lymphocytes (/mm ³)	1994 (642-4210)	1661.5 (939-2639)	0.127*
CD4 count (/mm ³)	218 (32-820)	622.5 (294-1008)	<0.0001*
CD8 count (/mm ³)	875.5 (347-3116)	382.5 (220-1135)	<0.0001*
CD4/CD8 ratio	0.225 (0.1-1.2)	1.45 (0.6-2.7)	<0.0001*

* P-value จากการวิเคราะห์สถิติแบบ nonparametric โดยวิธี Mann-Whitney U test

ข้อมูลการติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่มอาสาสมัครผู้ติดเชื้อ

กลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด 40 คนเป็นชาย 24 คน หญิง 16 คนคิดเป็นสัดส่วน 3:2 ระยะเวลาเฉลี่ย (\pm SD) ที่ทราบผลเลือดเป็นบวก (anti-HIV positive) เท่ากับ 46.75 ± 41.14 เดือน ซึ่งมีค่ามัธยฐานที่ 33 เดือน โดยมีพิสัยต่ำสุด – สูงสุดตั้งแต่ 0 ถึง 132 เดือนหรือ 11 ปี พฤติกรรมเสี่ยงในการรับเชื้อเอชไอวี ส่วนใหญ่มาจากเพศสัมพันธ์คิดเป็นร้อยละ 92.5 โดยเป็นเพศสัมพันธ์ต่างเพศร้อยละ 82.5 ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้าร่วมโครงการมีประวัติการติดเชื้อฉวยก่อนเข้าร่วมโครงการ 6 คน (15%) ได้แก่ วัณโรคปอด 3 คน ปอดอักเสบจากเชื้อ *Pneumocystis jiroveci* (PCP) 2 ราย และ penicilliosis 1 ราย ส่วนใหญ่ถึงร้อยละ 57.5 ยังไม่เคยกินยาต้านเชื้อเอชไอวี ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ขณะนี้กำลังกินยาต้านเชื้อเอชไอวีมีจำนวน 16 คนคิดเป็นร้อยละ 40 ที่เหลือ 1 รายเคยได้รับยาต้านช่วงตั้งครรภ์ตลอด สูตรยาต้านที่ใช้รักษาพบว่าร้อยละ 50 กินยาสูตร GPOVir ขององค์การเภสัชกรรม (8 คน) รองลงมาได้แก่สูตรยา NRTIs+efavirenz (EFV) 5 คน สูตรยาที่มี protease inhibitors 2 คนและสูตรยา 2 ตัวได้แก่ zidovudine (AZT)+didanosine (ddI) เพียง 1 คน โดยมีระยะเวลาเฉลี่ย (\pm SD) ของการเริ่มกินยาต้านเอชไอวีเท่ากับ 23.06 ± 21.66 เดือน รายละเอียดสรุปไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงความเสี่ยง ระยะเวลาการติดเชื้อและการรักษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี

	N (%)	Median (Min-Max)
พฤติกรรมเสี่ยง: เพศสัมพันธ์	37 (92.5%)	
ต่างเพศ (heterosexual)	33 (82.5%)	
เพศเดียวกัน (homosexual)	6 (15%)	
: เลือด	2 (5%)	
: การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน	1 (2.5%)	
การรักษา : naïve	23 (57.5%)	
Current treatment	16 (40%)	
: GPOVIR	8 (20%)	
: EFV based regimens	5 (12.5%)	
: PI based regimens	2 (5%)	

ตารางที่ 4 (ต่อ) แสดงความถี่ของ ระยะเวลาการติดเชื้อและการรักษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี

	N (%)	Median (Min-Max)
ระยะเวลาที่ติดเชื้อเอชไอวี (เดือน)		33 (0-132)
HIV status : CD4 count (/mm³)		218 (32-820)
CD4 > 500 (/mm ³)	13 (32.5%)	
CD4 200-499 (/mm ³)	21 (52.5%)	
CD4 < 200 (/mm ³)	6 (15%)	
Viral load : detectable (/mm ³)		12,996 (69-175,517)
Log VL		4.11 (1.84-5.24)
Viral load : undetectable	15 (37.5%)	

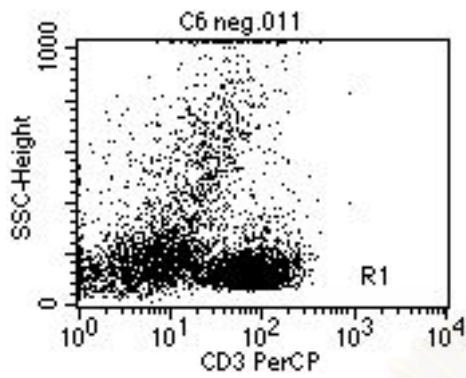
ผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมดที่เข้าร่วมโครงการเป็นกลุ่มที่ไม่แสดงอาการ (asymptomatic) และตรวจไม่พบภาวะติดเชื้อฉวยโอกาสอื่น เมื่อแบ่งกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้าโครงการตามเกณฑ์ของกรมควบคุมโรค สหรัฐอเมริกา (revised CDC classification system 1993) เพื่อประเมินระบบภูมิคุ้มกันตามจำนวน CD4 count จะพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้าร่วมโครงการส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม CD4 count มากกว่า 200 แต่ไม่ถึง 500 ตัวต่อซีซี ถึงร้อยละ 52.5 ผู้ติดเชื้อที่มีจำนวนเม็ดเลือด CD4 ≤ 200 ตัวต่อซีซี มีจำนวน 13 คน (32.5%) เมื่อพิจารณาความผิดปกติของเม็ดเลือดสมบูรณ์พบว่า ผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่วนใหญ่ไม่ซีด มีเพียง 6 รายที่มีค่าฮีโมโกลบินน้อยกว่า 12 g/dL โดยตรวจพบค่าต่ำสุดที่ 10.3 g/dL ซึ่งถือว่าซีดไม่มาก แต่มีถึงร้อยละ 42.5 ที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) น้อยกว่า 5,000 ตัวต่อซีซี สำหรับเม็ดเลือด eosinophils ใช้เกณฑ์คัดเฉพาะผู้ติดเชื้อที่มีจำนวน eosinophil น้อยกว่า 500 ตัวต่อซีซีเพื่อตัดตัวกวนจากการติดเชื้อแอบแฝง หรือโรคเรื้อรังบางชนิด ร่วมกับรายงานพบว่า eosinophil เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง IL-17 อย่างไรก็ดีตามเมื่อพิจารณา % eosinophil แล้วพบว่า มีถึงร้อยละ 20 ที่มี eosinophil เกินร้อยละ 5 ซึ่งจัดเป็นค่าสูงสุดของพิสัยปกติ และพบว่าผู้เข้าร่วมโครงการมี % eosinophil สูงสุดถึงร้อยละ 12.5 แม้ว่าจะมีจำนวน eosinophil ในเลือดน้อยกว่า 500 ตัวต่อซีซีก็ตาม แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีพบภาวะ pseudoeosinophilia ได้และควรคำนวณค่า absolute eosinophil count ก่อนเสมอ สำหรับปริมาณเกร็ดเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีพบว่ามีเพียงรายเดียวที่มีภาวะ thrombocytopenia (Platelet 26,000) โดยไม่มีอาการเลือดออกผิดปกติทางคลินิก

ผลการทดสอบ IL-17 Expression โดยวิธีย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์และ Flow Cytometry

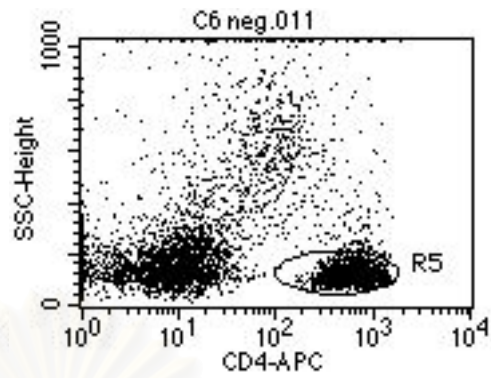
เซลล์ PBMC ที่แยกจากเลือดของอาสาสมัคร ประมาณ 1 ล้านเซลล์ต่อซีซีจะถูกแยกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่นำไปกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin เป็นเวลา 4 ชั่วโมง อีกกลุ่มจะเลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงชนิดเดียวกัน ใน incubator ภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกัน คือ อุณหภูมิ 37°C และความเข้มข้น 5% ของ CO₂ เป็น negative control และจึงผ่านขั้นตอนการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ CD4+ T cells ตามรายละเอียดในบทที่ 4 หลังจากนั้นจึงนำมานับเซลล์ที่ย้อมติดสี surface markers (CD3, CD4) และไซโตไคน์ภายในเซลล์ซึ่งได้แก่ IL-17 และ IFN-gamma โดยเครื่อง flow cytometry ซึ่งตัวอย่างสำหรับอาสาสมัครสุขภาพดี แสดงด้วย scatter diagram รูปที่ 12 และตัวอย่างสำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวี แสดงด้วย scatter diagram รูปที่ 13 สำหรับ scatter diagram ในรูปที่ 14 แสดงเซลล์ CD4+ T cells ก่อนและหลังกระตุ้นด้วย PMA/I ตัวเลขที่ระบุใน quadrant ด้านขวาบนแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีการ expression ของ markers ทั้ง 2 ชนิดตามแกน x และ แกน y ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin แล้ว เซลล์ CD4+ T cells สามารถสร้างไซโตไคน์ในสัดส่วนมากขึ้นทั้ง IL-17 และ IFN-gamma แต่ในอาสาสมัครบางรายตัวเลขไม่เพิ่มขึ้นได้เช่นกัน

สำหรับรูปที่ 15 แสดงการ co-expression ของ IFN-gamma และ IL-17 ในเซลล์ CD4+ T cells และ co-expression ของ IL-4 และ IL-17 ภายในเซลล์ CD4+ T cells ซึ่งจะเห็นว่า มีสัดส่วนของเซลล์ที่ express ไซโตไคน์เพียงอย่างเดียว และส่วนน้อยที่สามารถ express ไซโตไคน์ได้ทั้งสองชนิด (quadrant ขวาบน) แต่เนื่องจาก IFN-gamma เป็นไซโตไคน์ marker ที่สำคัญใน T helper 1 (Th1) polarization และ IL-4 เป็นไซโตไคน์ marker ที่สำคัญใน T helper 2 (Th2) polarization จึงน่าจะแสดงว่าส่วนใหญ่ของเซลล์ CD4+ T cells ที่มี IL-17 expression ไม่สามารถจัดเป็น Th1 หรือ Th2 polarization ได้หรือ เรียกว่ากลุ่ม Th0 นั่นเอง

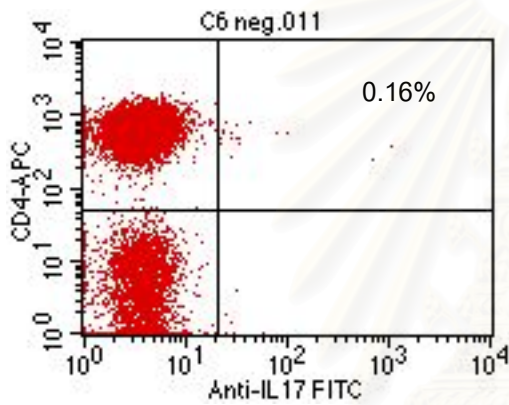
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



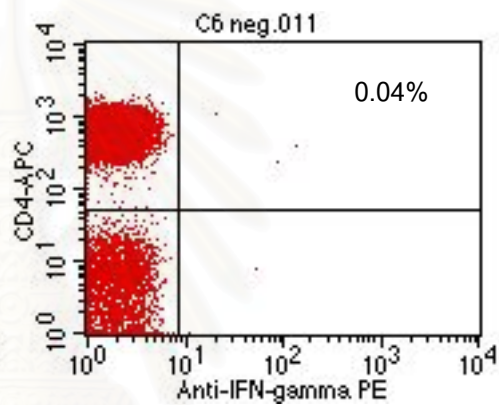
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

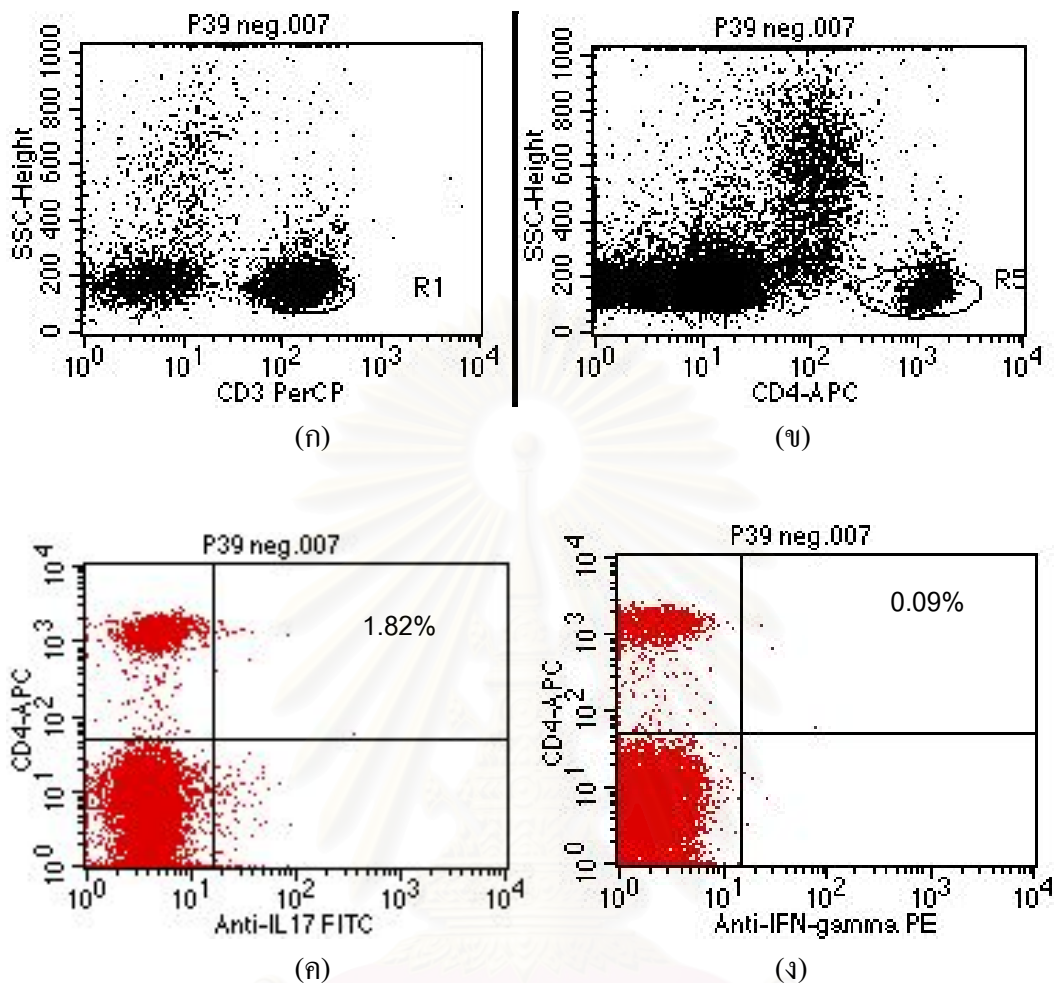
รูปที่ 12 แสดงตัวอย่าง Scatter Diagram ของ PBMC ในอาสาสมัครสุขภาพดี

ก) แสดงกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ติดสี anti-CD3 (Per-CP) ซึ่งจะอยู่ทางด้านขวา

ข) แสดงกลุ่มเซลล์ CD3 ทั้งหมดที่ติดสี anti-CD4 (APC) ซึ่งอยู่ในวงด้านขวา ส่วนกลุ่มเซลล์ทางด้านซ้ายเป็นเซลล์ CD3 ที่ไม่ติดสี anti-CD4 (APC)

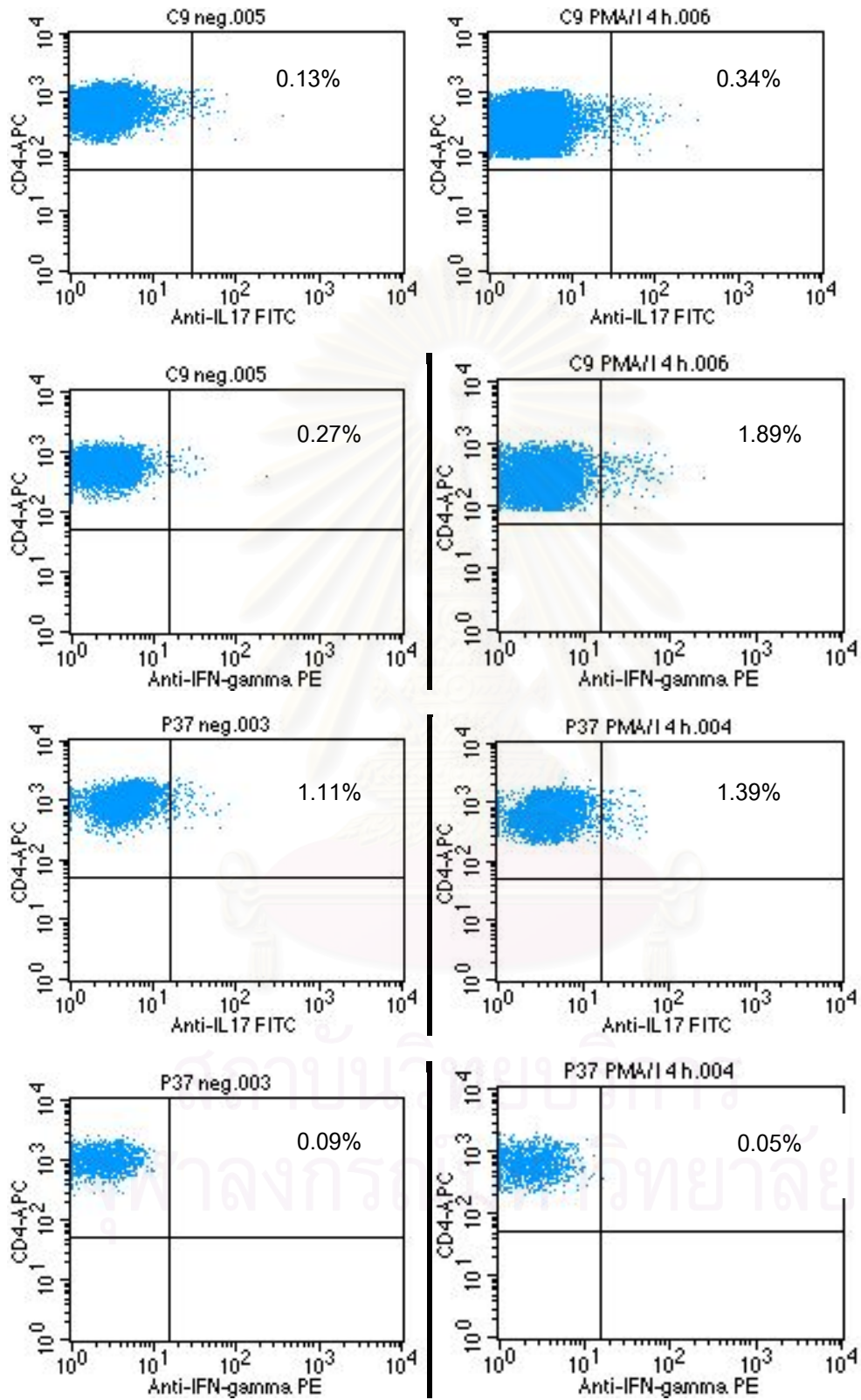
ค) แสดงกลุ่มเซลล์ CD3+CD4+ และ CD3+CD4- ที่ไม่ถูกกระตุ้นซึ่ง express IL-17 ภายในเซลล์แสดงตัวเลขเป็นร้อยละของการ expression (right upper quadrant) เซลล์ส่วนใหญ่ที่อยู่ใน left upper quadrant เป็นเซลล์ที่ไม่มี IL-17 expression

ง) แสดงกลุ่มเซลล์ CD3+CD4+ และ CD3+CD4- ที่ไม่ถูกกระตุ้นซึ่ง express IFN-gamma ภายในเซลล์แสดงตัวเลขเป็นร้อยละของการ expression (right upper quadrant) เซลล์ส่วนใหญ่ที่อยู่ใน left upper quadrant เป็นเซลล์ที่ไม่มี IFN-gamma expression

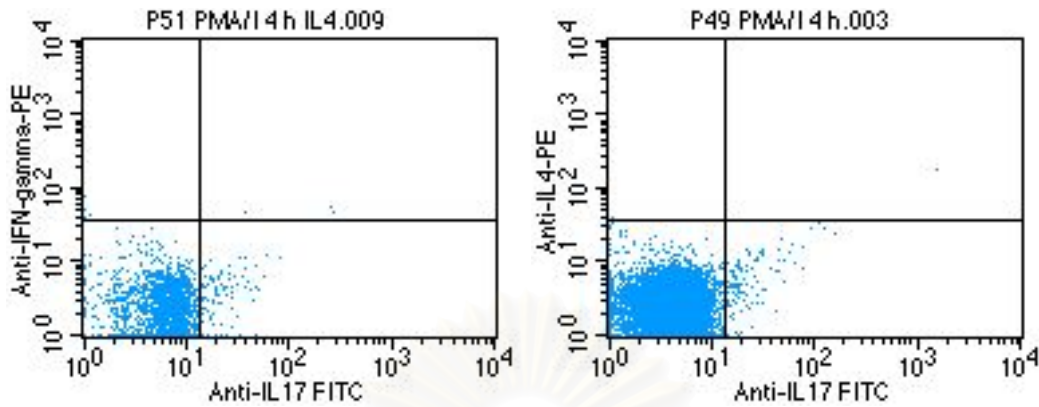


รูปที่ 13 แสดงตัวอย่าง Scatter Diagram ของ PBMC ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี

- ก) แสดงกลุ่มเซลล์ PBMC ที่ติดสี anti-CD3 (Per-CP) ซึ่งจะอยู่ทางด้านขวา (วงรอบไว้)
- ข) แสดงกลุ่มเซลล์ CD3 ทั้งหมดที่ติดสี anti-CD4 (APC) ซึ่งวงไว้ด้านขวา ส่วนกลุ่มเซลล์ทางด้านซ้ายเป็นเซลล์ CD3 ที่ไม่ติดสี anti-CD4 (APC)
- ค) แสดงกลุ่มเซลล์ CD3+CD4+ และ CD3+CD4- ที่ไม่ถูกกระตุ้นซึ่ง express IL-17 ภายในเซลล์ (right upper quadrant) เซลล์ส่วนใหญ่ที่อยู่ใน left upper quadrant เป็นเซลล์ที่ไม่มี IL-17 expression
- ง) แสดงกลุ่มเซลล์ CD3+CD4+ และ CD3+CD4- ที่ไม่ถูกกระตุ้นซึ่ง express IFN-gamma ภายในเซลล์ (right upper quadrant) และตัวเลขแสดงร้อยละของเซลล์ที่มี IFN-gamma expression เซลล์ส่วนใหญ่ที่อยู่ใน left upper quadrant เป็นเซลล์ที่ไม่มี IFN-gamma expression

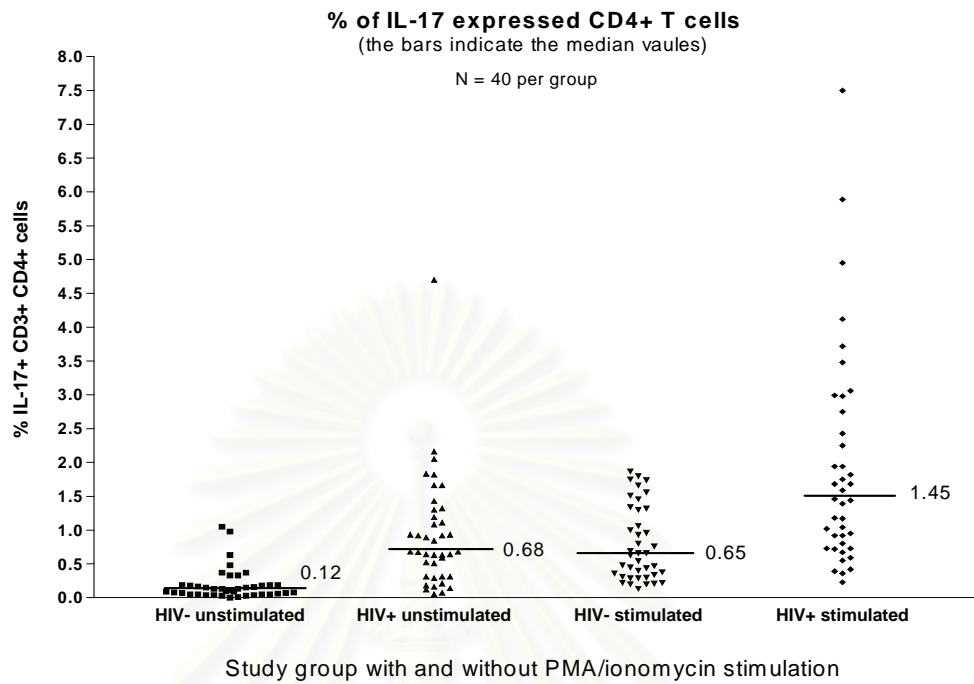


รูปที่ 14 แสดง Scatter Diagram ของ IL-17 Expression ก่อนและหลังกระตุ้น

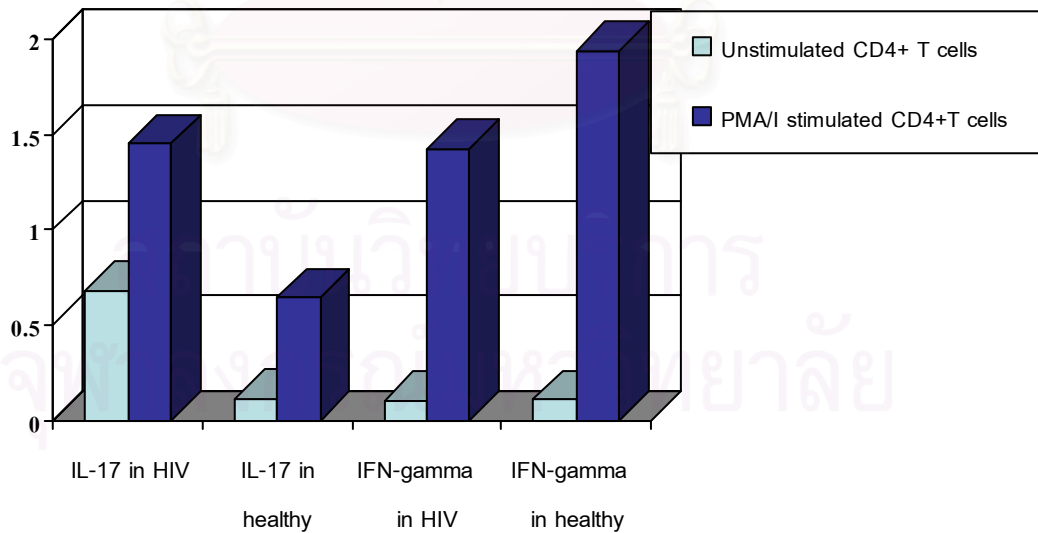


รูปที่ 15 แสดงตัวอย่าง Scatter Diagram ของ CD3+ CD4+ T cells หลังกระตุ้น ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งมี expression ของทั้ง IFN-gamma และ/หรือ IL-17 และ expression ทั้ง IL-4 และ/หรือ IL-17 : จาก รูป co-expression ของไซโตไคน์ภายในเซลล์พิจารณาจากเซลล์ใน quadrant บนขวาซึ่งมีค่าน้อยมาก อนุมานได้ว่าเซลล์ที่สร้าง IL-17 ที่ตรวจพบได้ในเซลล์ CD4+ T cells จากการศึกษาไม่น่ามี polarization ไปทาง Th1 หรือ Th2 ทางใดทางหนึ่ง

เมื่อนำร้อยละของ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับการ กระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ของอาสาสมัครแต่ละคนในแต่ละกลุ่มมา plot เป็น scatter diagram ดังรูปที่ 16 และค่ามัธยฐานของร้อยละ IL-17 expression ในแต่ละกลุ่มแสดงให้เห็นความแตกต่างชัดเจนด้วยแผนภูมิแท่งดังรูปที่ 17 เมื่อนำค่าเฉลี่ยและค่ามัธยฐานของ expression ของทั้ง IL-17 และ IFN-gamma ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่มมาแสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งถ้าพิจารณาเปรียบเทียบสัดส่วนของ IL-17 expression ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ในภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูก กระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ดังตารางที่ 6 จะเห็นว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะแสดงสัดส่วนของ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยทางสถิติระหว่างอาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มในกรณี IFN-gamma สำหรับการเปรียบเทียบสัดส่วนของร้อยละ IL-17 และ IFN-gamma expression ก่อนและ หลังถูกกระตุ้น ได้แสดงดังตารางที่ 7 จะเห็นว่า หลังจากถูกกระตุ้นเซลล์ CD4+ T cells ของทั้ง อาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีสามารถตอบสนองโดยการสร้างไซโตไคน์ทั้งสองชนิด ภายในเซลล์ได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าในสภาวะไม่ผ่านการกระตุ้นด้วย PMA และ Ionomycin อย่างมี นัยสำคัญ ($p < 0.0001$) โดยสามารถพิจารณาการเปลี่ยนแปลงก่อนและหลังถูกกระตุ้นด้วย PMA/ ionomycin ของเซลล์ CD4+ T cells ในอาสาสมัครแต่ละรายของกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้ดังรูปที่ 18 และของกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีดังรูปที่ 19

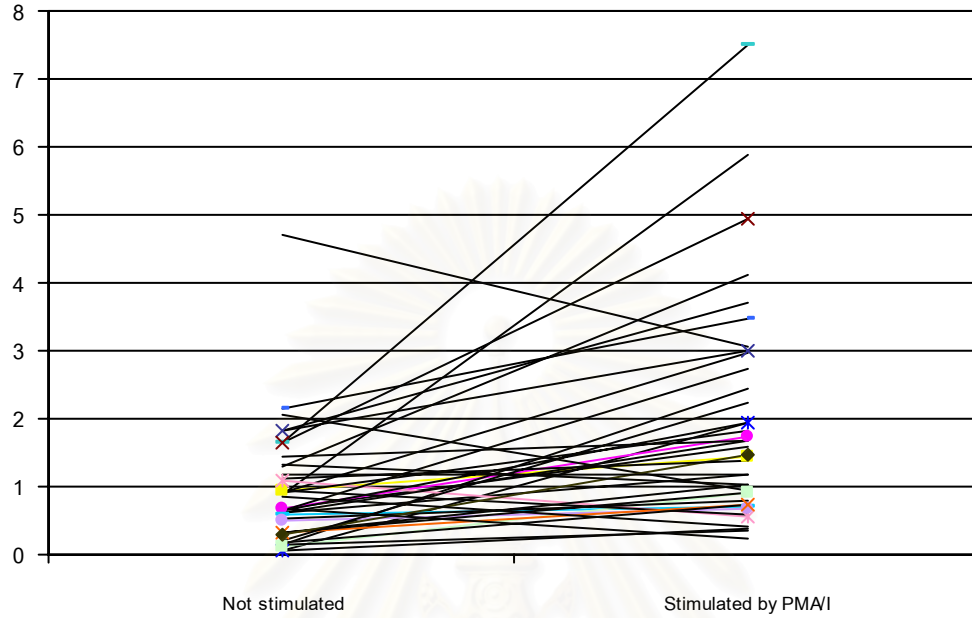


รูปที่ 16 แสดง Scatter Diagram ของค่า % IL-17 Expression ภายใน CD4+ T cells ของอาสาสมัคร สุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี (1 จุดต่อ 1 คน)



รูปที่ 17 แสดงแผนภูมิรูปแท่งเปรียบเทียบค่ามัธยฐานของร้อยละ Expression ของไซโตไคน์ก่อนและ หลังกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี

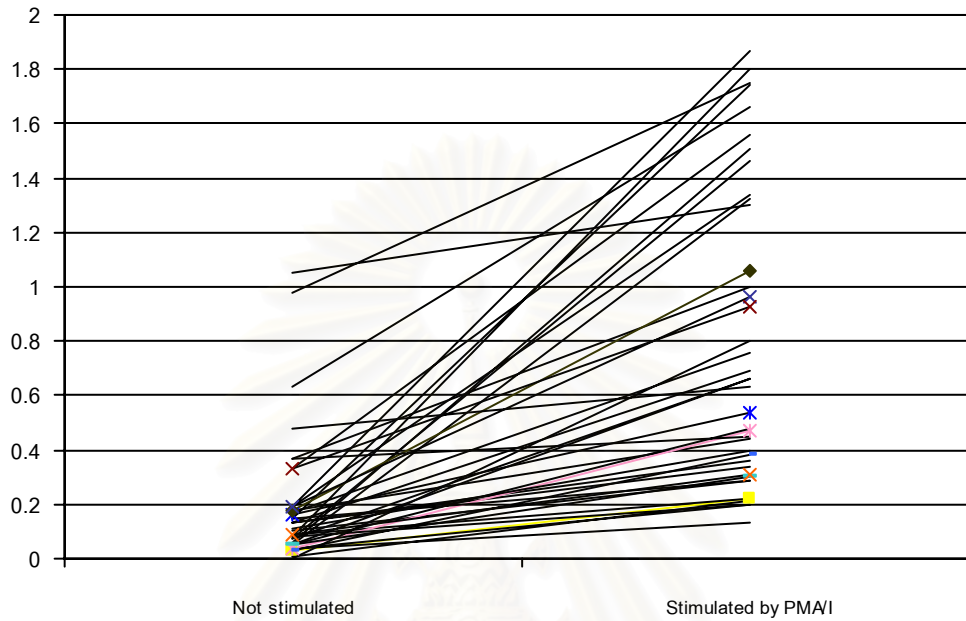
% IL-17 expression



รูปที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ % IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells ก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย PMA/I ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละราย ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นหลังถูกกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

% IL-17 expression



รูปที่ 19 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ % IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells ก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย PMA/I ภายในเซลล์ CD4+ T cells ของอาสาสมัครสุขภาพดีแต่ละราย ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยและค่ามัธยฐานของ Cytokine Expression ภายใน CD4+ T Cells ทั้งที่ผ่านการกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ของอาสาสมัครในแต่ละกลุ่ม

CD3+ CD4+ T cells	%IL-17 expression by ICCS		%IFN-gamma expression by ICCS	
	Mean ± SD	Median (Min- Max)	Mean ± SD	Median (Min- Max)
HIV infected patients				
: Unstimulated cells	0.93 ± 0.84	0.68 (0.05-4.7)	0.26 ± 0.38	0.105 (0-2.01)
: PMA/Ionomycin stimulated cells	1.91 ± 1.59	1.45 (0.23-7.5)	4.0 ± 6.72	1.42 (0.02-33.01)
Healthy volunteers				
: Unstimulated cells	0.19 ± 0.23	0.12 (0-1.05)	0.17 ± 0.22	0.11 (0-1.13)
: PMA/Ionomycin stimulated cells	0.79 ± 0.55	0.645 (0.13-1.87)	2.72± 2.71	1.935 (0.9-11.72)

ICCS= Intracellular cytokine staining

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์ T Helper Cells ที่มี IL-17 Expression หรือ IFN-gamma Expression ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี

Cytokines expression	Unstimulated CD4+ T cells %Median (Min-Max)			PMA/Ionomycin stimulated CD4+ T cells %Median (Min-Max)		
	HIV	Healthy	P-value	HIV	Healthy	P-value
IL-17	0.68 (0.05-4.7)	0.12 (0-1.05)	<0.0001*	1.45 (0.23-7.5)	0.645 (0.13-1.87)	<0.0001*
IFN-γ	0.105 (0-2.01)	0.11 (0-1.13)	0.427*	1.42 (0.02-33.01)	1.935 (0.9-11.72)	0.338*

* nonparametric analysis by Mann Whitney U test significant P-value < 0.05

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์ CD4+ T cells ที่แสดง IL-17 Expression หรือ IFN-gamma Expression ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยไมโทเจนในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี

Cytokines expression	HIV-infected patients %Median (Min-Max)			Healthy volunteers %Median (Min-Max)		
	unstimulated	PMA/I	P-value	unstimulated	PMA/I	P-value
IL-17	0.68 (0.05-4.7)	1.45 (0.23-7.5)	<0.0001*	0.12 (0-1.05)	0.645 (0.13-1.87)	<0.0001*
IFN- γ	0.105 (0-2.01)	1.42 (0.02-33.01)	<0.0001*	0.11 (0-1.13)	1.935 (0.9-11.72)	<0.0001*

* nonparametric analysis by Wilcoxon test, significant P-value < 0.05

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของ % expression ของ IL-17 และ IFN- γ ภายในเซลล์ CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ของอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี และวิเคราะห์ความแตกต่างของทั้งสองกลุ่ม

Cytokine expression in CD4+ T cells	Median of the % expression difference		
	HIV infected patients	Healthy volunteers	P-value*
IL-17	0.67 (-1.64 to 5.84)	0.43 (0.08 to 1.72)	0.288
IFN- γ	1.31 (-0.06 to 31.72)	1.64 (0.09-11.42)	0.281

The % expression difference = % expression in stimulated CD4+ T cells - % expression in unstimulated CD4+ T cells

* nonparametric analysis by Mann Whitney U test, significant P-value <0.05

เมื่อพิจารณาความแตกต่างของร้อยละ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells หลังถูกกระตุ้นเทียบกับไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin จากอาสาสมัครแต่ละคนซึ่งสามารถแสดงด้วยค่ามัธยฐานของความแตกต่างในการ expression และเปรียบเทียบความแตกต่างของการ expression ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีของทั้ง IL-17 expression และ IFN- γ expression จึงสรุปได้ว่าการกระตุ้นด้วยไมโตเจนสามารถเพิ่มสัดส่วน expression ของทั้ง IL-17 และ IFN- γ ได้อย่างมีนัยสำคัญของทั้งผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีแต่กลับไม่พบความแตกต่างระหว่างผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเอชไอวี

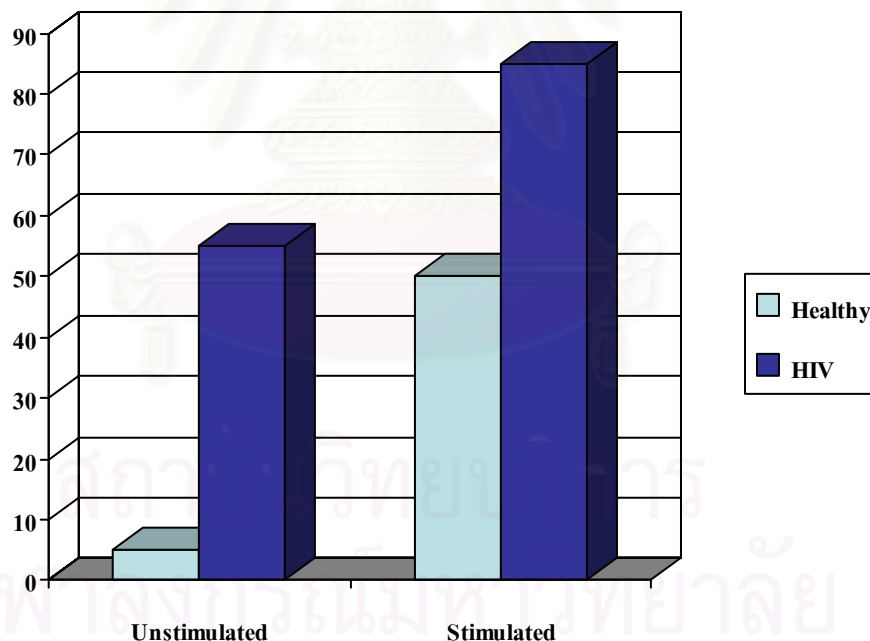
การ expression ของ IL-17 และ IFN- γ ภายใน CD4+ T cells จะแตกต่างกันระหว่างกลุ่มเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/I อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่ากลุ่มเซลล์ CD4+ T cells ที่ผ่านการกระตุ้นจะให้ค่า expression ของไซโตไคน์ดังกล่าวสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี แต่เมื่อพิจารณาความแตกต่างดังกล่าวในอาสาสมัครแต่ละรายระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีโดยดูความแตกต่างจากการเปลี่ยนแปลงของ expression ภายในเซลล์ของ IL-17 และ IFN- γ หลังการกระตุ้นแล้วจะเห็นว่าไม่พบความแตกต่างระหว่างการเปลี่ยนแปลงของไซโตไคน์ทั้งสอง แสดงให้เห็นว่า เซลล์ CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีสามารถสร้างไซโตไคน์ทั้งสองตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PMA/ionomycin ได้ไม่แตกต่างจากอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

การพิจารณา IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+T cells เมื่อใช้ค่า Cutpoint

เมื่อนำค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ IL-17 expression ของเซลล์ CD4+ T cells ที่ยังไม่ถูกกระตุ้น จากกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีมาใช้คำนวณหาค่า cutpoint เพื่อวัตถุประสงค์ในการระบุค่าร้อยละของ IL-17 expression ที่เหมาะสมในการแสดงการเปลี่ยนแปลงหลังกระตุ้นและลดปัญหาเรื่อง false positive result จากการแปลผลหรือตัวกวนจากการติดสี background ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็น baseline ในการศึกษานี้จึงระบุให้ค่าร้อยละของ IL-17 expression ที่มากกว่า ค่าเฉลี่ย เกินสองเท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean + 2SD) จากตารางที่ 5 เมื่อคำนวณในกรณีนี้แล้วจะได้ค่าเท่ากับ ร้อยละ 0.65 ซึ่งเมื่อนำไปตัดข้อมูลที่มีค่าน้อยกว่าที่กำหนดนี้ในแต่ละกลุ่ม จะได้จำนวนอาสาสมัครที่แสดงร้อยละของ IL-17 expression สูงกว่าค่าดังกล่าว เมื่อนำมาแสดงสัดส่วนของจำนวนตัวอย่างอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีค่า IL-17 expression มากกว่าค่าดังกล่าว นำเสนอเป็นแผนภูมิได้ดังรูปที่ 20

จากรูปจะเห็นได้ว่า เมื่อนำสัดส่วนในแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบกันจะพบว่า กลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีสามารถแสดง IL-17 Expression ในเซลล์ CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นได้สูงกว่าค่า baseline ที่ตั้งไว้ในสัดส่วนที่สูงกว่ากลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (55% VS 5%, $p < 0.0001$; 85% VS 50%, $p = 0.001$ ตามลำดับ) แต่เมื่อเปรียบเทียบ IL-17 expression ที่มีค่าสูงกว่าค่า baseline ระหว่างไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นในแต่ละกลุ่มอาสาสมัครพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแม้ว่าหลังการกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin จะแสดงร้อยละของ IL-17 expression สูงกว่าไม่ถูกกระตุ้นก็ตาม โดยในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 50 ($p = 0.487$) และกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีเพิ่มจากร้อยละ 55 เป็นร้อยละ 85 ($p = 0.533$)

รูปที่ 20 แผนภูมิแท่งแสดงร้อยละของสัดส่วน IL-17 expression ในเซลล์ CD4+ T cells ที่มี expression มากกว่าค่า cutpoint (Mean+2SD) หรือ 0.65% ทั้งในกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin จากกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี



การพิจารณา IL-17 expression ภายในเซลล์ CD3+CD4- T cells และ CD3+ T cells

ด้วยกระบวนการตรวจหา IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells หรือ CD3+CD4+ cells โดยวิธีการย้อมสีและ flow cytometry ในการศึกษานี้ ทำให้สามารถหา IL-17 expression ภายในกลุ่มเซลล์อื่นได้เช่นกัน เมื่อพิจารณากลุ่มเซลล์ที่ย้อมติดสี CD3 marker บนผิวเซลล์ซึ่งถือว่าเป็น T cells กลุ่มที่ย้อมไม่ติด CD4 marker (CD3+CD4- cells) หรืออนุมานว่าอาจจะเป็น CD4-CD8+ หรือ CD4-

CD8- T cells นั้นสามารถสรุปผลการตรวจหาร้อยละการ expression ของ IL-17 และ IFN- γ ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีได้ดังตารางที่ 9 และเปรียบเทียบความแตกต่างของการ expression ของ IL-17 และ IFN- γ ระหว่างก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย PMA/ionomycin ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มดังแสดงด้วยตารางที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่าแม้ว่าเซลล์กลุ่ม CD3+CD4- T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีนั้นจะมีการสร้าง IL-17 และ IFN- γ ในภาวะไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ได้ในสัดส่วนที่สูงกว่าในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) ก็ตามแต่เซลล์กลุ่ม CD3+CD4- T cells ไม่สามารถตอบสนองต่อการถูกกระตุ้นด้วย PMA/ionomycin ให้เพิ่มการสร้าง IL-17 ภายในเซลล์ได้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญได้ทั้งในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ($p=0.268$ และ $p=0.742$ ตามลำดับ) และเมื่อนำ ร้อยละ IL-17 expression ก่อนและหลังกระตุ้นมาหาความแตกต่างในแต่ละคนของแต่ละกลุ่มประชากร (ค่ามัธยฐานในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี 0.09, พิสัย -0.91 ถึง 5.38 VS กลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี 0.01, พิสัย -0.56 ถึง 0.43) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p=0.158$) ในทางตรงข้ามกลับเห็นการตอบสนองของ IFN- γ expression ได้ชัดเจนหลังการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญในประชากรทั้งสองกลุ่ม ($p<0.0001$)

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบร้อยละของ IL-17 Expression หรือ IFN- γ Expression ภายในเซลล์ CD3+CD4- T cells ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี

Cytokines expression	Unstimulated CD4- T cells			PMA/Ionomycin stimulated CD4- T cells		
	%Median (Min-Max)			%Median (Min-Max)		
	HIV	Healthy	P-value	HIV	Healthy	P-value
IL-17	0.915 (0.06-2.59)	0.09 (0.01-0.78)	<0.0001*	1.0 (0.15-7.82)	0.12 (0.01-0.63)	<0.0001*
IFN- γ	0.275 (0.02-1.56)	0.1 (0.01-1.27)	0.03*	3.11 (0.06-28.69)	3.04 (0.04-42.67)	0.51*

* nonparametric analysis by Mann Whitney U test significant P-value < 0.05

ตารางที่ 10 แสดงการเปรียบเทียบร้อยละของ IL-17 Expression หรือ IFN- γ Expression ภายใน CD3+CD4- cells ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยโมโตเจน ในอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี

Cytokines expression	HIV-infected patients			Healthy volunteers		
	unstimulated	PMA/I	P-value	unstimulated	PMA/I	P-value
IL-17	0.915 (0.06-2.59)	1.0 (0.15-7.82)	0.268*	0.09 (0.01-0.78)	0.12 (0.01-0.63)	0.742*
IFN- γ	0.275 (0.02-1.56)	3.11 (0.06-28.69)	<0.0001*	0.1 (0.01-1.27)	3.04 (0.04-42.67)	<0.0001*

* nonparametric analysis by Wilcoxon signed rank test, significant P-value < 0.05

ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองในการ Expression ของ IL-17 ภายในเซลล์ CD4+ T cells

เซลล์ที่สร้าง IL-17 และ conditions ที่เกี่ยวข้องกับ pathways ของไซโตไคน์ย่อมมีผลต่อบทบาทของ IL-17 รวมไปถึง expression ของ IL-17 เช่นกัน ดังนั้นเมื่อควบคุม conditions ต่าง ๆ จากการเตรียมระเบียบวิจัยที่กล่าวมาร่วมกับเกณฑ์คัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ จึงคงเหลือแต่ปัจจัยทางกายภาพและระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องเท่านั้นในการพิจารณาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ IL-17 expression ดังแสดงด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่าง IL-17 expression กับตัวแปรที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ไว้ใน ตารางที่ 11 และ 12

จากตารางที่ 11 จะเห็นว่าการจับคู่ความสัมพันธ์ของปัจจัยที่นำมาวิเคราะห์กับ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี ทั้งก่อนและหลังกระตุ้นส่วนใหญ่จะแสดงความสัมพันธ์อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่พบว่าเกี่ยวข้องกัน ยกเว้น IFN- γ expression ที่ให้ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ IL-17 expression เมื่อไม่ถูกกระตุ้น ($P < 0.0001$) และสัมพันธ์กับ IL-17 expression หลังถูกกระตุ้น ($P = 0.028$ และ $P = 0.016$) ส่วนความแตกต่างของ IL-17 expression ก่อนและหลังกระตุ้นนั้นไม่แสดงความสัมพันธ์กับตัวแปรใด ๆ อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 11 แสดงปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องในการพิจารณาความสัมพันธ์กับ IL-17 Expression ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี

ปัจจัยที่นำมาพิจารณา	IL-17 Expression ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี N= 40		
	Unstimulated	Stimulated by PMA/I	Difference of % expression
Sex*	0.433, P=0.858	0.307, P=0.805	0.758, P=0.685
Age**	-0.134, P=0.411	0.084, P=0.605	0.169, P=0.297
Hematocrit**	-0.2, P=0.215	-0.028, P=0.862	0.084, P=0.605
Neutrophil count**	0.131, P=0.514	-0.027, P=0.869	-0.104, P=0.521
Eosinophil count**	-0.122, P=0.455	-0.202, P=0.212	-0.15, P=0.354
CD4 count**	-0.095, P=0.56	-0.150, P=0.354	-0.110, P=0.501
CD4/CD8**	-0.163, P=0.315	-0.116, P=0.475	-0.033, P=0.839
Viral load**	0.167, P=0.302	0.253, P=0.115	0.18, P=0.266
IFN- γ expression**	0.771, P<0.0001	0.347, P=0.028	-0.065, P=0.69
Unstimulated cells	0.209, P=0.195	0.377, P=0.016	0.291, P=0.068
Stimulated cells			

* Correlation by Chi-square test, significant P value when P<0.05

**Bivariate Correlation analysis by Pearson test, significant P value when P<0.05

สำหรับการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของปัจจัยต่าง ๆ ว่ามีผลต่อ IL-17 expression ของเซลล์ CD4+ T cells หลังถูกกระตุ้นและไม่ได้กระตุ้น รวมถึงความแตกต่างของร้อยละ IL-17 expression ก่อนและหลังกระตุ้นด้วย PMA/ionomycin ในอาสาสมัครสุขภาพดีได้สรุปไว้ในตารางที่ 12 ซึ่งจะเห็นว่ายังพบความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง IL-17 expression และ IFN- γ expression ได้ทั้งในกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น (p=0.002) และที่ผ่านการกระตุ้น (p=0.011) นอกจากนี้ IL-17 expression ใน CD4+ T cells หลังถูกกระตุ้นและความแตกต่างของ IL-17 expression ก่อนและหลังกระตุ้นด้วยไมโทเจนในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดียังมีความสัมพันธ์กับร้อยละเม็ดเลือดขาว CD4+ T cells และ CD4/CD8 ratio ไปในทิศทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.001 สำหรับ IL-17 expression หลังถูกกระตุ้น และ p=0.009 และ p=0.003 ตามลำดับสำหรับความแตกต่างของ IL-17

ก่อนและหลังกระตุ้น) กล่าวคือถ้ามีร้อยละ CD4 cells และ CD4/CD8 ratio ต่ำจะยิ่งตอบสนองต่อการเพิ่มขึ้นของร้อยละ IL-17 expression สูงขึ้นอย่างสัมพันธ์กัน

ตารางที่ 12 แสดงปัจจัยทางกายภาพของคนไข้และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องในการพิจารณาความสัมพันธ์กับ IL-17 Expression ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี

ปัจจัยที่นำมาพิจารณา	IL-17 Expression ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี N= 40		
	Unstimulated	Stimulated by PMA/I	Difference of % expression
Sex*	0.002, P=0.985	0.002, P=0.985	1.052, P=0.305
Age**	-0.128, P=0.431	-0.156, P=0.338	-0.113, P=0.489
Hematocrit**	-0.306, P=0.054	-0.313, P=0.049	-0.203, P=0.208
Neutrophil count**	0.036, P=0.823	0.139, P=0.393	0.137, P=0.398
Eosinophil count**	-0.234, P=0.147	-0.43, P=0.379	-0.048, P=0.767
% CD4**	-0.302, P=0.058	-0.492, P=0.001	-0.405, P=0.009
CD4/CD8**	-0.237, P=0.140	-0.510, P=0.001	-0.456, P=0.003
IFN- γ expression**	0.478, P=0.002	0.117, P=0.472	-0.097, P=0.552
Unstimulated cells	-0.17, P=0.917	0.399, P=0.011	0.453, P=0.03
Stimulated cells			

* Correlation by Chi-square test, significant P value when $P < 0.05$

**Bivariate Correlation analysis by Pearson test, significant P value when $P < 0.05$

ปัจจัยที่มีผลต่อ IL-17 Expression ในเซลล์ CD4+ T cells

เมื่อพิจารณาข้อมูลที่ได้จากตารางการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า IL-17 expression ในเซลล์ CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นน่าจะขึ้นกับปัจจัยที่อาจมีผลกระตุ้นเซลล์ภายในร่างกายของอาสาสมัครก่อนนำมาตรวจ และเนื่องจาก IFN- γ เป็น cytokine marker ที่สำคัญของ CD4+ T cells ในกลุ่ม Th1 จึงเป็นไปได้ว่า ความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเป็นเพียง coincidence เท่านั้น หรือ IFN- γ อาจมีผลทางอ้อมต่อการสร้าง IL-17 ก็ได้ ส่วนกรณีมีการกระตุ้น CD4+ T cells พบว่า IL-17 expression มีความเกี่ยวข้องกับ IFN- γ expression เช่นกัน อย่างไรก็ตามร้อยละของ CD4+ T cells และ CD4/CD8 ratio แสดงความสัมพันธ์กับ IL-17 expression เฉพาะในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี

ดีเท่านั้น โดยความสัมพันธ์เกิดขึ้นในทิศทางตรงกันข้ามกันกล่าวคือ ถ้าร้อยละ CD4+ T cells สูงจะมี IL-17 expression ในสัดส่วนที่น้อยกว่า เพื่อให้มั่นใจว่าความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นเส้นตรงหรือไม่สามารถตรวจสอบได้โดยการวิเคราะห์การถดถอยซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 13 เมื่อพิจารณาจะพบว่าสมการถดถอยที่ได้จากการวิเคราะห์ไม่สามารถเป็นเส้นตรงได้ เนื่องจาก ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R2) มีค่าน้อยเพียง 0.262 และแม้ว่าการวิเคราะห์การถดถอยจะให้ความเชื่อมั่นที่ $P=0.027$ ซึ่งเป็นระดับความเชื่อมั่นของ F test ที่มีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่เมื่อพิจารณาตัวแปรแต่ละตัวแล้วไม่สามารถหาตัวแปรอิสระที่มีค่าความเชื่อมั่นจาก T test ที่ให้ค่า $p<0.05$ ได้เลยจึงสรุปได้ว่า model ของกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีไม่มีปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่อ IL-17 expression หลังได้รับการกระตุ้นแล้ว

สำหรับการวิเคราะห์การถดถอยแบบเส้นตรงในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี ซึ่งแสดงในตารางที่ 14 นั้นพบว่าแม้ F test จะแสดงความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญในการเป็นตัวแปรอิสระของปัจจัยที่คัดมาวิเคราะห์ แต่ก็เหมือนในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีปัจจัยใดเลยที่ให้ผลแสดงความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญในการเป็นปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับ IL-17 expression หลังการกระตุ้นในอาสาสมัครสุขภาพ เช่นกัน กล่าวโดยสรุปว่าไม่มีปัจจัยใดที่มีความสัมพันธ์กับ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells ทั้งในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง

ตารางที่ 13 แสดงผลลัพธ์จากการวิเคราะห์การถดถอยเพื่อหาตัวแปรอิสระที่สามารถเป็นปัจจัยกำหนด IL-17 Expression หลังกระตุ้น CD4+ T Cells ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.512	.262	.178	1.44050

a Predictors: (Constant), Log VL, %IFN +, %CD4, %IFN unstimulated

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	25.820	4	6.455	3.111	.027
	Residual	72.627	35	2.075		
	Total	98.446	39			

a Predictors: (Constant), Log VL, %IFN +, %CD4, %IFN unstimulated

b Dependent Variable: %IL-17 stimulated

Coefficients

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.998	.848		1.177	.247
	%IFN +	.071	.043	.299	1.642	.110
	%IFN neg	.859	.765	.204	1.123	.269
	%CD4	-.032	.031	-.158	-1.032	.309
	Log VL	.268	.177	.230	1.509	.140

a Dependent Variable: %IL-17 stimulated

ตารางที่ 14 แสดงผลลัพธ์จากการวิเคราะห์การถดถอยเพื่อหาตัวแปรอิสระที่สามารถเป็นปัจจัยกำหนด IL-17 Expression หลังกระตุ้น CD+ T Cells ในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.640	.410	.342	.44424

a Predictors: (Constant), HCT, CD4/CD8, %IFN +, %CD4

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	4.795	4	1.199	6.074	.001
	Residual	6.907	35	.197		
	Total	11.702	39			

a Predictors: (Constant), HCT, CD4/CD8, %IFN stimulated, %CD4

b Dependent Variable: %IL-17 stimulated

Coefficients (a)

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	3.018	.805		3.749	.001
	%CD4	-.017	.014	-.232	-1.235	.225
	CD4/CD8	-.301	.200	-.286	-1.505	.141
	%IFN +	.035	.029	.173	1.210	.234
	HCT	-.030	.016	-.257	-1.897	.066

a Dependent Variable: %IL-17 stimulated

a. ความสัมพันธ์ของระดับ CD4 Cells ต่อ IL-17 Expression

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างระดับ CD4+ cell count กับ IL-17 expression ในเซลล์ CD4+ T cells หลังกระตุ้นแล้วพบว่า ระดับ CD4+ T cells ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพตามที่คาดไว้ล่วงหน้า แต่ร้อยละของ CD4+ T cells และ CD4/CD8 ratio ยังแสดงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี ดังนั้นเมื่อนำ CD4+ T cells count ในผู้ติดเชื้อและอาสาสมัครสุขภาพดีมาแยกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ <200, 200-499 และ > 500 ตัวต่อซีซีเพื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับสัดส่วนของ IL-17 expression ที่สูงกว่าค่า cutpoint ที่กล่าวมาแล้ว ดังตารางที่ 15 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้ว่าจะมีแนวโน้มว่าความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางกันข้ามกล่าวคือ ระดับ CD4+ T cells ที่ต่ำจะมีสัดส่วนของ IL-17 expression สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ CD4+ T cells ที่ได้รับการกระตุ้นจากกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี (p=0.038) แต่ไม่พบ

ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดีในกรณีไม่ถูกกระตุ้น ($p=0.527$) และกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี ($p=0.127$, ในกรณีไม่ถูกกระตุ้น; $p=0.344$, กรณีถูกกระตุ้น)

ตารางที่ 15 แสดงความสัมพันธ์และกระจายตัวของจำนวนอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี เมื่อพิจารณา CD4+ cell count และ IL-17 Expression ในเซลล์ที่ถูกและไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin

CD4 cell count	IL-17 expression in HIV infected patients		IL-17 expression in healthy volunteers (N)	
	unstimulated	stimulated	Unstimulated	Stimulated*
CD4 $\geq 500/\text{mm}^3$	2/6	4/6	1/28	11/28
CD4 200-499/ mm^3	10/21	18/21	1/12	9/12
CD4 < 200/ mm^3	10/13	12/13	NA	NA

* significant difference by Pearson χ^2

b. ยาด้านเชื้อไวรัสเอชไอวี และ IL-17 Expression

ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เป็นอาสาสมัครในการศึกษานี้มี 16 รายที่กำลังกินยาด้านเชื้อเอชไอวีอยู่ ผู้ติดเชื้อที่กินยาและไม่กินยาด้านเชื้อไวรัสไม่มีระดับ CD4 cell count และ CD4/CD8 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.594$ และ $p=0.486$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทานยาด้านเชื้อไวรัสแล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างของ IL-17 expression ทั้งในเซลล์ CD4 ที่กระตุ้นและไม่ได้กระตุ้น ($p=0.902$ และ $p=0.318$ ตามลำดับ) อีกทั้งยังไม่พบความแตกต่างของ IFN-gamma expression ในเซลล์ CD4+ T cells ที่กระตุ้นและไม่ได้กระตุ้น ($p=0.244$ และ $p=0.774$ ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของ IL-17 expression ก่อนและหลังกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin แล้วยังพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่กำลังกินยาด้าน และไม่ได้กินยาด้านเชื้อเอชไอวี ทางสถิติ ทั้ง IL-17 expression และ IFN-gamma expression ($p=0.202$ และ 0.095 ตามลำดับ)

c. ภาวะ Eosinophilia ในเลือด และการ IL-17 Expression

เนื่องจากเซลล์ eosinophil สามารถสร้าง IL-17 ได้บ้างและภาวะ eosinophilia อาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัยเช่น การติดเชื้อในกลุ่มพยาธิหรือเชื้อวัณโรค หรือโรคในกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอักเสบ ซึ่งถือว่าเป็นภาวะที่มีการอักเสบอยู่ในร่างกาย จึงได้คัดอาสาสมัครที่มี eosinophil count มากกว่า 500 ตัวต่อซีซีออกไปจากโครงการ อย่างไรก็ตามเทคนิคที่ใช้ในการวัด IL-17 คือการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ CD4+ T cells ซึ่งถือเป็นเซลล์ที่สร้างไซโตไคน์ชนิดนี้เป็นหลัก ภาวะ eosinophilia จึงน่าจะมีผล

น้อยเนื่องจากเป็นกลุ่ม asymptomatic HIV infection ซึ่งจากการนำอาสาสมัครที่คัดออกไปนี้มารวมเป็นข้อมูลใหม่ พบว่ามีลักษณะของกลุ่มประชากรทั้งอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีดังตารางที่ 16

เมื่อนำข้อมูลของกลุ่ม eosinophilia ของทั้งอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อไปเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มี eosinophilia พบว่า IL-17 expression และ IFN-gamma expression ของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) มีเพียงค่าฮีโมโกลบินของกลุ่มที่มี eosinophilia มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญในอาสาสมัครสุขภาพดี ($p = 0.012$) และมีแนวโน้มต่ำกว่าแต่ไม่มีนัยสำคัญ ($p = 0.056$) แม้จะสรุปข้อมูลดังกล่าวได้ยากเนื่องจากมีจำนวน N ในกลุ่มนี้น้อยเกินไป แต่พอจะสร้างความมั่นใจได้บ้างว่าวิธี ICCS ในการตรวจ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4 T cells น่าจะไม่ถูกรบกวนด้วยภาวะ eosinophilia ด้วยเหตุผลที่ระบุไว้แล้วข้างต้น

d. การติดเชื้อฉวยโอกาส และ IL-17 Expression

เช่นเดียวกับภาวะ eosinophilia การติดเชื้อถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ IL-17 ได้อย่างชัดเจนจึงถือเป็นเกณฑ์ในการคัดผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีประวัติการติดเชื้อฉวยโอกาส อย่างไรก็ตามได้มีการแยกเลือดตัวอย่างไปทำการตรวจและพิจารณาเปรียบเทียบกับร้อยละของ IL-17 expression ใน CD4+ T cells แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น IFN-gamma expression และ CD4 count ของผู้ติดเชื้อที่มีการติดเชื้อฉวยโอกาสจะแสดงค่าต่ำกว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้าร่วมโครงการอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.04$ และ $p = 0.03$ ตามลำดับ)

ตารางที่ 16 แสดงลักษณะของกลุ่มประชากรตัวอย่างที่มีภาวะ Eosinophilia ทั้งอาสาสมัครสุขภาพดี และผู้ติดเชื้อเอชไอวี

Characteristic (Eosinophilia group)	Median (Min-Max)	
	Healthy volunteer (N=4)	HIV infected volunteers (N=6)
Male:Female	4:0	3:3
Age (year)	38 (26-51)	31 (27-34)
Hb (g/dL)	15.1 (13.6-15.7)	11.95 (9.8-14.7)
WBC (/mm ³)	5970 (5430-6560)	6225 (5130-7720)
Absolute neutrophils(/mm ³)	3288 (2750-3500)	3114 (2860-4120)
Absolute eosinophils (/mm ³)	745.5 (570-961)	900.5 (509-1103)
CD4 count (/mm ³)	620.5 (312-833)	220.5 (10-991)
CD4/CD8 ratio	1.43 (1.17-1.84)	0.205 (0.02-1.1)
%IL-17 expression, unstimulated	0.565 (0.04-1.05)	1.115 (0.24-8.73)
%IL-17 expression, stimulated	0.865 (0.22-1.97)	1.23 (0.12-14.51)
%IFN-gamma expression, unstimulated	0.11 (0.01-1.41)	0.37 (.04-2.91)
%IFN-gamma expression, stimulated	1.195 (.3-5.37)	0.735 (0.08-17.51)
Duration of HIV infection (month)	NA	16 (1-33)
Currently on ARV (%)	NA	16.67%

บทที่ 6

อภิปรายผลการวิจัย

6.1 ข้อมูลพื้นฐานของประชากรตัวอย่าง

6.1.1 ความแตกต่างของอายุอาสาสมัครไม่พบว่าสัมพันธ์กับ IL-17 expression ใน CD4+T cells

การศึกษานี้มีประชากรเข้าร่วมการวิจัย 2 กลุ่ม ได้แก่ อาสาสมัครสุขภาพดีซึ่งเป็นผู้บริจาคเลือดที่ศูนย์บริการโลหิต สภากาชาดไทย และผู้ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งเป็นผู้ป่วยนอกโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และคลินิกนิรนาม สภากาชาดไทย การวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานเปรียบเทียบระหว่างประชากรทั้งสองพบว่าอายุเป็นปัจจัยเดียวที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.001$) โดยผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งมีอายุตั้งแต่ 20-60 ปี เป็นกลุ่มที่อายุสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีซึ่งมีอายุตั้งแต่ 20-51 ปี และส่วนใหญ่ถึงร้อยละ 65 มีอายุน้อยกว่า 30 ปี อย่างไรก็ตามประชากรทั้งสองกลุ่มมีการกระจายในทุกช่วงอายุ ปัจจัยทางอายุอาจมีผลต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในการศึกษานี้ได้เมื่อตั้งสมมุติฐานว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งพบว่ามีอายุมากกว่าน่าจะแสดงความผิดปกติของ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells แต่เมื่อพิจารณาผลการศึกษาพบว่าผลตอบสนองดังกล่าวในประชากรทั้งสองกลุ่มมีสัดส่วนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังการกระตุ้นด้วย PMA/ionomycin (ค่ามัธยฐานของ % IL-17 expression กรณีไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี 0.68 VS 1.45 และกลุ่มอาสาสมัครสุขภาพดี 0.12 VS 0.645, $p<0.0001$) และไม่พบความแตกต่างของ IL-17 expression ของก่อนและหลังกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ภายในเซลล์ CD4+ T cells ระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี (0.67 VS 0.43, $p=0.288$) ร่วมกับผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของอายุกับความแตกต่างของ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells กรณีไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ยังพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันทั้งในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ($p=0.297$ และ $p=0.489$ ตามลำดับ) ดังนั้นความแตกต่างด้านอายุของประชากรทั้งสองจึงไม่น่าจะมีความสำคัญมากนักกับตัววัดของการศึกษานี้

การไม่พบความแตกต่างที่สัมพันธ์กับอายุของอาสาสมัครในประชากรทั้งสองกลุ่มในการศึกษานี้ยังหมายรวมถึง IFN- γ expression ภายในเซลล์ CD4+T cells ด้วย ซึ่งพบว่า IFN- γ expression ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี ไม่สัมพันธ์กับอายุของอาสาสมัคร ($p=0.111$, ข้อมูลไม่ได้แสดง

ในผลการศึกษา) ซึ่งไม่เหมือนกับผลการศึกษาของ Eylar EH และคณะ (116) ที่พบว่า IFN- γ expression เพิ่มสูงขึ้นถึง 4-5 เท่าในผู้สูงอายุเทียบกับวัยหนุ่มสาวที่ติดเชื้อเอชไอวี

6.1.2 ข้อจำกัดในการคัดเลือกประชากร

การเลือกประชากรในงานวิจัยนี้มีข้อจำกัด เนื่องจากอาสาสมัครสุขภาพดีที่มาจากเลือดคนนั้นทางสภากาชาดไทยได้กำหนดอายุไว้แล้วและส่วนใหญ่ของผู้ที่มาจากมักอยู่ในวัยเรียน หนุ่มสาว ทำให้อายุเฉลี่ยต่ำกว่าผู้ติดเชื้อซึ่งมักอยู่ในวัยทำงาน มีครอบครัวแล้ว ภูมิภานาของอาสาสมัครทั้งสองกลุ่มส่วนใหญ่อยู่ในกรุงเทพฯ และปริมณฑล (ร้อยละ 80 ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี และร้อยละ 97.5 ของอาสาสมัครสุขภาพดี, $p=0.085$) เนื่องจากเป็นงานวิจัยที่ทำในกรุงเทพฯ และสถานที่คัดเลือกอาสาสมัครอยู่ในกรุงเทพฯ จึงทำให้การกระจายประชากรไม่ครอบคลุมทุกพื้นที่ อย่างไรก็ตามเนื่องจากตัววัดสำคัญที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันซึ่งไม่ควรพบปัจจัยความแตกต่างที่เกี่ยวข้องจากเรื่องถิ่นที่พำนัก และผู้เข้าร่วมโครงการทุกคนเป็นกลุ่มประชากรไทยที่มีเชื้อพวงค์เดียวกันซึ่งน่าจะมีลักษณะทางระบบภูมิคุ้มกันใกล้เคียงกัน ในทางกลับกันการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของตัววัดทางภูมิคุ้มกันในระยะเริ่มต้นเช่นการศึกษานี้ควรทำในกลุ่มประชากรที่มี homogeneity กันก่อน เพื่อให้สามารถสรุปความแตกต่างได้ชัดเจนโดยไม่มีตัวกวนจากลักษณะทางพันธุกรรม

การศึกษานี้ได้พยายามตัดสภาวะต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ IL-17 เช่นการติดเชื้อร่วม โรคเรื้อรัง ภาวะ eosinophilia เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลทางห้องปฏิบัติการทุกชนิดที่ระบุไว้ในระเบียบวิธีวิจัยนั้นไม่พบความแตกต่างทางสถิติยกเว้นระดับ CD4 count ซึ่งเป็นปัจจัยซึ่งผู้วิจัยสนใจว่าอาจมีผลต่อตัววัดที่ต้องการศึกษา

6.2 ผลการทดสอบ IL-17 expression ใน CD4+ T cells โดยเทคนิค ICCS และ Flow Cytometry

การตรวจหา IL-17 ในการศึกษาที่ใช้วิธีการย้อมไซโตไคน์หรือร้อยละ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells (ICCS) เนื่องจากเป็นวิธีตรวจที่ไวกว่าการวัดระดับไซโตไคน์ใน supernatant(117-119) ซึ่งเป็นการตรวจไซโตไคน์ที่หลั่งออกมาออกเซลล์แล้วด้วยวิธี ELISA หรือ radioimmunoassay เป็นต้น อีกทั้ง ICCS ยังเป็นเทคนิคที่สามารถระบุเซลล์ซึ่งสร้างไซโตไคน์ที่ต้องการศึกษาอย่างจำเพาะได้ในระดับเซลล์และสามารถระบุจำนวน และ/หรือ ร้อยละของ CD4+ T cells ที่สร้าง IL-17 ภายในเซลล์ได้เช่นกัน ข้อดีของเทคนิคนี้ยังลดปัญหาความผิดพลาดจากการแยกเซลล์ที่ต้องการศึกษาค้น เนื่องจาก IL-17 สามารถสร้างจากเซลล์อื่น ๆ เช่น eosinophils, CD3+CD8+

T cells เป็นต้น ได้ซึ่งอาจปนเปื้อนมากับตัวอย่างเลือดที่แยกจากอาสาสมัครได้ แม้จะได้ผ่านกระบวนการแยกเซลล์มาแล้วจึงลดปัญหาการแปลผลผิดพลาด

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้พยายามลดตัวกวนจากสภาวะต่าง ๆ ที่อาจกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอาสาสมัคร เช่น การคัดออกอาสาสมัครที่มีอาการเจ็บป่วย เป็นไข้ หรือมีโรคเรื้อรัง การระบุจำนวน neutrophils ไว้ในข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ผลการศึกษา รวมไปถึงการคัดเลือกเฉพาะอาสาสมัครที่มีจำนวน eosinophils อยู่ในเกณฑ์ปกติ (น้อยกว่า 500 ตัวต่อไมโครลิตร) ด้วย

6.2.1 IL-17 expression ใน CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin

ข้อมูลปัจจุบันระบุว่า เฉพาะเซลล์ CD4+ T cells ที่ถูกกระตุ้นเท่านั้น (activated CD4+ T cells) ที่เป็นแหล่งในการสร้าง IL-17 และไม่พบการสร้างในเซลล์ CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้น (16, 23-24) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่แม้ว่าการสร้าง IL-17 สามารถตรวจพบได้ภายในเซลล์ CD4+ T cells ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ได้เช่นกัน แต่ค่าการวัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำโดยพบว่ามีค่ามัธยฐานของร้อยละ IL-17 expression ใน CD4+ T cells ในอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี เพียงร้อยละ 0.12 (พิสัย 0-1.05) อย่างไรก็ตามในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี baseline IL-17 expression ในเซลล์ CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นกลับแสดงผลในสัดส่วนที่สูงกว่าอาสาสมัครที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ร้อยละ 0.68 พิสัย 0.05-4.7, $p < 0.0001$) หรือ ผู้ติดเชื้อเอชไอวีถึงร้อยละ 50 แสดงค่าร้อยละ IL-17 expression ใน CD4+ T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดี (55% VS 5% ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาตัดค่าการวัดด้วยค่าร้อยละ IL-17 expression ที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของอาสาสมัครสุขภาพดีถึง 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ปรากฏการณ์นี้น่าจะเกิดขึ้นจากการติดเชื้อเอชไอวีเรื้อรังซึ่งเป็นภาวะ dynamic state ดังนั้นเชื้อไวรัสในร่างกายจะแบ่งตัวตลอดเวลาจึงมีการกระตุ้นเซลล์ CD4+ T cells อย่างต่อเนื่องซึ่งตรวจพบการเพิ่มขึ้นของร้อยละ CD4+HLA-DR+ T cells และ CD4+CD25+ T cells ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี เทียบกับอาสาสมัครที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี (120) ดังนั้นการติดเชื้อเอชไอวีจึงเป็นสภาวะที่ก่อให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสทำให้มีการสร้างไซโตไคน์เพิ่มขึ้น (121-123) และ polyclonal T cells activation (124-126) หรืออาจอธิบายผ่านปรากฏการณ์ที่พบว่า การอักเสบเรื้อรังจะทำให้ acute phase proteins เพิ่มขึ้นในผู้ติดเชื้อเอชไอวี (127-128) จึงเป็นไปได้ว่าบทบาทของ IL-17 อาจมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ acute phase proteins ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีเหมือนกับไซโตไคน์อื่น เช่น IL-6, IL-8 เป็นต้น (129-131)

6.2.2 IL-17 expression ใน CD4+ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระตุ้นเซลล์ CD4+ T cells ด้วยสาร PMA และ Ionomycin ทำให้เกิดภาวะ CD4 downregulation และอาจมีผลต่อการเลือกเซลล์ CD4+ T cells ที่นำมาตรวจหา IL-17 expression เนื่องจาก surface CD4 marker เป็น marker สำคัญที่ใช้บ่งชี้ว่าเซลล์ที่กำลังศึกษาเป็นเซลล์ T helper cells ปกติการกระตุ้นดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจาก CD4 เป็น surface marker ที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งจากภายนอกและภายในเซลล์ (dynamic structure) (103) เช่นเดียวกับโปรตีนรับสัญญาณที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น TCR/CD3 complex, CD8, glycosylphosphatidylinositol (GPI) จะเกิด downregulation ได้พร้อมกับกระบวนการ activation ซึ่งน่าจะเป็นกระบวนการในการสร้างสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน กลไกในการเกิด downregulation มีหลายวิธี เช่น GPI ใช้วิธี shedding, TCR/CD3 เริ่มจาก endocytosis ตามด้วย recycling กลับมา cell surface อีกครั้ง สำหรับ CD4 เกิดจาก degradation ใน phagolysosomes ดังนั้นการยับยั้งกระบวนการ acidification ของ phagolysosome จะทำให้ตรวจพบ endocytosed CD4 ได้ จากการศึกษาของ Pata และคณะ (103) พบว่าเมื่อกระตุ้น CD4+ T cells ด้วย PMA และ ionomycin จะเกิด downregulation CD4 เหลือเพียง 13.2% ที่ 6 ชั่วโมง เทียบกับ 99% ที่เวลา 0 ชั่วโมงซึ่งถือว่าเป็น resting CD4+ T cells แม้ปรากฏการณ์ดังกล่าวถือเป็นข้อจำกัดของการศึกษา แต่เมื่อได้ปรับเทคนิคการย้อมสีภายในเซลล์ โดยย้อม surface markers เช่น CD3, CD4 ก่อนขั้นตอน fixation ทำให้ปรากฏการณ์ CD4 downregulation ลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่าร้อยละ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells หลังถูกกระตุ้นของอาสาสมัครสุขภาพดีในการศึกษานี้ (0.79 ± 0.55) มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้ที่ผ่านมา (87, 115) การศึกษานี้เป็นงานวิจัยแรกที่ระบุถึง IL-17 expression ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี แม้ว่าจะไม่มีรายงานการศึกษานี้ให้อ้างถึงแต่ผลตรวจวัด IL-17 expression ใน CD4+ T cells ในการศึกษานี้ทำให้ทราบว่า IL-17 เป็นไซโตไคน์ที่มี expression น้อยเหมือน IL-4 จึงต้องอาศัยเทคนิคในการตรวจวัดและติดตามที่มีความไวสูง ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ICCS เป็นเทคนิคสำหรับการตรวจหา IL-17 ที่มีความเหมาะสม

ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ CD4+ T cells สร้าง IL-17 และ IFN- γ ภายในเซลล์ในสัดส่วนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ทั้งในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี ($p < 0.0001$) เนื่องจาก PMA และ Ionomycin เป็นสารกระตุ้นเซลล์ที่แรงและผ่านการทำงานในระดับยีน และเมื่อพิจารณาความแตกต่างของ IL-17 expression และ IFN- γ expression ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.288$ และ $p = 0.281$ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่แสดงอาการทางคลินิกสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไมโตรเจนได้ดีและไม่แตกต่าง

จากอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี การที่เซลล์ CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีเกิดการตอบสนองด้วยการเพิ่ม IL-17 และ IFN- γ expression สูงขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจนในหลอดทดลอง อาจอธิบายได้จากสมมุติฐานเรื่องการเกิด polarization จาก Th1 ไปเป็น Th0 ของกลุ่ม memory T cells ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี (132-134) จึงทำให้เกิด IL-17 expression และ IFN-gamma expression สูงขึ้นทั้งคู่ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี

6.2.3 IL-17 expression ใน T cells ชนิดอื่น (CD3+CD4- cells) ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin

เมื่อพิจารณาเซลล์ CD3+ T cells ชนิดอื่นที่ไม่ติดสี CD4 marker ซึ่งรวม CD8+ T cells และ CD4-CD8- T cells พบว่า IL-17 expression ในเซลล์ดังกล่าวที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีค่าสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (0.915 VS 0.09, $p < 0.0001$) แต่เมื่อกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin กลับไม่พบว่าการตอบสนองด้วยการสร้าง IL-17 ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นทั้งผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี (0.915 VS 1.0, $p = 0.268$ และ 0.09 VS 0.12, $p = 0.742$ ตามลำดับ) ผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างจาก IFN- γ expression ซึ่งให้ผลตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ด้วยค่าที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี (0.275 VS 3.11, $p < 0.0001$ และ 0.1 VS 3.04, $p < 0.0001$ ตามลำดับ) เหมือนที่พบในเซลล์ CD4+ T cells ปรัชญาการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การติดเชื้อเอชไอวีสามารถกระตุ้นเซลล์แบบ polyclonal T cell activation ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาในเซลล์ CD4+ T cells ที่กล่าวมาแล้ว และ IL-17 เป็นไซโตไคน์ที่มี expression ในเซลล์ต่ำแม้จะเป็นเซลล์ที่มีรายงานว่าสามารถหลั่งไซโตไคน์นี้ได้อย่าง CD4+ T cells และ CD8+ T cells ยิ่งไปกว่านั้นสนับสนุนว่า IL-17 สร้างมาจาก activated CD4+ T cells เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากเมื่อกระตุ้นด้วยไมโตเจนแล้วสามารถเพิ่มการสร้างได้อย่างมีนัยสำคัญแต่สำหรับ T cells กลุ่มอื่น เช่น CD8+ T cells จะไม่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การตอบสนองของ CD8+ T cells ต่อการกระตุ้นด้วยไมโตเจนด้วยการสร้าง IFN- γ สามารถเกิดขึ้นให้เห็นได้ชัดเจน

6.2.4 IFN- γ expression ใน CD3+CD4+ T cells และ CD3+CD4- T cells ที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin

การตอบสนองของเซลล์กลุ่มต่าง ๆ ต่อไมโตเจนด้วยการพิจารณาการสร้างไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ จากการ expression ภายในเซลล์จะทำให้ทราบแหล่งของไซโตไคน์ชนิดนั้น และสามารถนำไซโตไคน์นั้นมาใช้เป็นตัวติดตามในแง่พยาธิวิทยา การวินิจฉัยและการรักษาในอนาคตได้ การตัดสินใจเลือกตรวจ IFN- γ เพื่อศึกษาร่วมกับ IL-17 ซึ่งถือเป็นตัววัดหลักในการศึกษานี้ เนื่องจากผลการศึกษาในหลายงานวิจัย (103, 116, 135) แสดงให้เห็นว่า IFN-gamma เป็นไซโตไคน์ที่ถูกกระตุ้นให้สร้างและหลั่งได้ง่ายกว่าไซโตไคน์ชนิดอื่น เช่น IL-4, IL-10 จึงน่าจะนำมาพิจารณาเป็น positive control เพื่อแสดงว่ามีกระบวนการกระตุ้นเซลล์ CD4+ T cells จริงได้ การพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ IFN- γ นอกจากจะช่วยให้เป็นตัวชี้บ่งกระบวนการกระตุ้นเซลล์ CD4+ T cells แล้ว เนื่องจากตัวอย่างเลือดคนไข้บางรายพบว่ามี IL-17 expression เท่าเดิมหรือลดลงหลังถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน แต่มีการเพิ่มสัดส่วน IFN- γ expression หลังกระตุ้นจึงสามารถระบุว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นสามารถเป็นไปได้ ไม่ได้เกิดจากความผิดพลาดจากเทคนิคในห้องปฏิบัติการเท่านั้น นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของ IFN- γ อาจนำมาอนุมานความผิดปกติในหน้าที่ของ CD4+ T cell ที่เป็น Th1 polarization ได้เช่นกัน

เมื่อพิจารณาผลของ IFN- γ expression ในการศึกษานี้ พบว่า IFN- γ expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells หลังกระตุ้นด้วยไมโตเจนที่วัดได้จากการศึกษานี้ได้ผลคล้ายกับการศึกษาที่ผ่านมา (115-116, 135) การกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ภายในเซลล์ CD3+CD4+ และ CD3+ CD4- T cells ได้อย่างมีนัยสำคัญทั้งในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อ ($p < 0.0001$) และไม่พบความแตกต่างของ IFN- γ expression ทั้งกรณีไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ($p = 0.281$) แสดงให้เห็นว่าเซลล์ทั้งสองกลุ่มของผู้ติดเชื้อเอชไอวีสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยไมโตเจนได้ดีไม่แตกต่างจากผู้ไม่ติดเชื้อเอชไอวี แต่เนื่องจาก IFN- γ expression ภายในเซลล์ทั้งสองกลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเหมือนที่พบความแตกต่างของ IL-17 expression ในเซลล์ทั้งสองกลุ่มระหว่างอาสาสมัครทั้งที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเอชไอวีจึงเป็นไปได้ว่า IL-17 expression อาจจะมีควมไวจากการอักเสบในโรคติดเชื้อเรื้อรัง ซึ่งอาจจะนำมาพิจารณาเป็นตัวติดตามในกระบวนการดูแลผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้ในอนาคต แม้ว่าจะมีข้อจำกัดในเรื่องการตรวจวัดไซโตไคน์นี้ซึ่งต้องพัฒนารายละเอียดวิธีตรวจวัดให้ไวกว่านี้หรือใช้เทคนิคอื่นในการตรวจวัด

6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการ expression ของ IL-17 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับการสร้างและบทบาทของ IL-17 นั้นพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการ expression ของ IL-17 น่าจะเกี่ยวข้องกับขบวนการกระตุ้นผ่านทาง innate immunity ซึ่งรวมไปถึงภาวะติดเชื้อ ภาวะอักเสบในร่างกาย และเมื่อพิจารณาถึงเซลล์ต้นกำเนิดของไซโตไคน์นี้แล้วจะเห็นว่า CD4+ T cells เป็นเซลล์ส่วนใหญ่ที่สร้างสารนี้จึงน่าจะมีผลต่อการ expression ของ IL-17 ร่วมกับผลการศึกษาในสัตว์ทดลอง (35) พบว่า IL-17 deficient mice จะแสดงภาวะผิดปกติของ hypersensitivity response และ T cell-dependent antibody production ที่ลดลง ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวน่าจะมีผลมาจาก CD4+ T cells อย่างไรก็ตามผลการวัด IL-17 expression ในเซลล์ CD4+ T cells ในการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า CD4+ T cells ของทั้งอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวีสามารถ express IL-17 และ IFN- γ ได้ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังถูกกระตุ้นด้วย PMA/ Ionomycin ที่ 4 ชั่วโมงและความแตกต่างของ IL-17 expression ไม่แตกต่างกันระหว่างอาสาสมัครสุขภาพดีและผู้ติดเชื้อเอชไอวี จึงเป็นไปได้ว่า ไม่มีความผิดปกติของ IL-17 และ IFN- γ expression หลังกระตุ้นจริง และสมมุติฐานที่คาดไว้ว่าจะเกิดขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีผิด หรือ CD4+ T cells ยังอาจมีความผิดปกติที่จำเพาะต่อแอนติเจน หรือเชื้อโรคนั้นๆ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความผิดปกติในการศึกษาที่ซึ่งใช้ PMA/Ionomycin เป็นตัวกระตุ้นได้ เนื่องจากไมโตเจนดังกล่าวสามารถกระตุ้น CD4+ T cells ได้แบบ polyclonal stimulation จึงทำให้กลุ่มเซลล์ที่ปกติสามารถตอบสนองได้สูงขึ้น และทำให้ร้อยละของ IL-17 expression โดยรวมยังไม่แสดงความผิดปกติ ความเป็นไปได้ข้อหนึ่งคือ การที่มี IL-17 expression สูงกว่าปกติอาจเป็นผลมาจาก ปริมาณตัวรับสัญญาณสำหรับ IL-17 (IL-17R) ลดลงหรือเป็นในทางกลับกัน (vice versa) เป็น feedback ให้เกิดความสมดุลต่อภาวะติดเชื้อเรื้อรัง ซึ่งในที่สุดส่งผลให้ไม่เกิดการตอบสนองของนิวโทรฟิลต่อเชื้อแบคทีเรียและทำให้ติดเชื้อได้ง่ายขึ้นจาก receptor defects (47)

แม้ว่าผลการศึกษาไม่พบว่าจำนวน CD4+ T cells ที่ต่างกันจะมีผลต่อร้อยละการ expression ของทั้ง IL-17 และ IFN-gamma ภายในเซลล์ CD4+ T cells ซึ่งสอดคล้องกันการศึกษาที่ผ่านมาในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่พบว่า การ expression ของไซโตไคน์ภายใน เซลล์ PBMC โดยเฉพาะ IFN- γ จะแสดงสัดส่วนที่ไม่สัมพันธ์กับ CD4+ T cell count ตาม CDC classification (122, 132, 136) ซึ่งต่างจากบางการศึกษาที่พบความแตกต่างและนำ cytokine expression เช่น IFN- γ มาใช้ติดตามและประเมินระยะของโรครวมถึงพยากรณ์โรคได้ (137-138) การที่มี IFN- γ expression เพิ่มขึ้นในการติดเชื้อ HIV เชื่อว่า Interferons มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิกำเนิดในแง่การสร้างสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันและส่งผลต่อการทำลายเชื้อไวรัสด้วย(139)

สำหรับผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของ IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ IFN- γ expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$ ในกรณีไม่ถูกกระตุ้น และ $p = 0.028$ ในกรณีถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin) ซึ่งเป็นไปได้ว่าไซโตไคน์ทั้งสองหลังมาจากเซลล์ CD4+ T cells เหมือนกัน ทั้งในสถานะถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้น การหลังของไซโตไคน์ทั้งคู่จึงแปรตามกันไป หรือ ภาวะ Th0 polarization ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีทำให้ไซโตไคน์ทั้งสองชนิด ซึ่งสร้างจาก Th0 (13, 15) นี้สูงขึ้นแปรตามกัน อีกสมมุติฐานหนึ่งเป็นไปได้ว่า การติดเชื้อเอชไอวีทำให้เซลล์ CD4+ T cells อยู่ในภาวะถูกกระตุ้นตลอดเวลา IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells ที่มีสัดส่วนสูงขึ้นอาจกระตุ้นให้มี IFN- γ expression เพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กัน ทำให้น่าเชื่อว่า IL-17 เป็นไซโตไคน์ที่เชื่อมประสานภูมิคุ้มกันชนิด innate immunity และ adaptive immunity จึงพบความสัมพันธ์กับ IFN- γ expression ดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำตัวแปรที่อาจมีผลต่อการ expression ของ IL-17 ภายใน CD4+ T cells มาวิเคราะห์แบบสมการถดถอยเชิงเส้นตรง พบว่าไม่มีตัวแปรใดที่ส่งผลต่อ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells โดยตรงในลักษณะ independent factor ได้เลย

ประวัติการรักษาด้วยยาต้านเชื้อเอชไอวีไม่เกี่ยวข้องกับสัดส่วนการ expression ของทั้ง IL-17 และ IFN- γ ภายในเซลล์ CD4+ T cells ในการศึกษา ซึ่งให้ผลคล้ายการศึกษาที่ผ่านมาที่พยายามวัดผลกระทบของการรักษาด้วยยาต้านเชื้อเอชไอวีต่อ cytokines expression โดยเฉพาะ IFN- γ (14) เนื่องจาก IFN- γ expression แสดงถึงความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันที่พยายามจะรักษาสมดุลเพื่อให้ร่างกายสามารถอยู่รอดได้ เมื่อร่างกายทรุดโทรมส่วนหนึ่งจะแสดงด้วยการลดลงของจำนวนเซลล์ภูมิคุ้มกันและไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องซึ่งน่าจะเป็นธรรมชาติของโรคที่มีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันมากกว่าจะเป็นผลมาจากยา อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่พบว่าระดับเชื้อไวรัสในเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีผลต่อ expression ของทั้ง IL-17 และ IFN- γ ภายในเซลล์ CD4+ T cells

บทที่ 7

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

7.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา แบบ Cross-sectional study เพื่อศึกษา IL-17 expression ภายในเซลล์ CD4+ T cells ณ. ก่อนและภายหลังการกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิคการย้อมไซโตไคน์ภายในเซลล์ (ICCS) และตรวจด้วย Flow cytometry ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีเปรียบเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

ผลการวิจัยพบว่าสัดส่วนของ IL-17 expression ใน CD4+ T cells ในภาวะทั้งไม่ถูกกระตุ้น และถูกกระตุ้นด้วยไมโทเจนของผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีค่าสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (ค่ามัธยฐาน 0.68 VS 0.12 และ 1.45 VS 0.645 ตามลำดับ, $p < 0.0001$) และเมื่อวิเคราะห์ผลในกลุ่ม CD4- T cells (CD8+ T cells, CD4-CD8- T cells) พบว่าร้อยละของ IL-17 expression เมื่อไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin ในผู้ติดเชื้อเอชไอวียังให้ค่าสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ (ค่ามัธยฐาน 0.92 VS 0.09, $p < 0.0001$) แม้ว่าหลังกระตุ้นร้อยละของ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells จะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดี ($p < 0.0001$) แต่ค่าที่เพิ่มขึ้นหลังกระตุ้นจากภาวะที่ไม่ถูกกระตุ้นในผู้ติดเชื้อเอชไอวีเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดีมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (0.67 VS 0.43, $p = 0.288$) ผลการวิเคราะห์ตัวแปรต่าง ๆ ได้แก่ อายุ, เพศ, CD4+ T cell count, CD4/CD8 ratio, IFN- γ expression ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรงกับการเปลี่ยนแปลงของ IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells แต่อย่างใด

IL-17 expression ภายใน CD4+ T cells ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วย PMA/Ionomycin มีค่าสูงกว่าอาสาสมัครสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าภาวะติดเชื้อเอชไอวีเรื้อรังก่อให้เกิดการกระตุ้น CD4+ T cells ให้มีการสร้าง IL-17 อย่างต่อเนื่อง ดังนั้น IL-17 จึงเป็นไซโตไคน์อีกชนิดหนึ่งที่บ่งถึงภาวะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวีแม้ในระยะที่ยังไม่แสดงอาการทางคลินิกใด ๆ ก็ตาม

7.2 ข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้พบว่า IL-17 expression จากการยึดเกาะภายในเซลล์ CD4+ T cells แสดงสัดส่วนในเกณฑ์ต่ำซึ่งน่าจะปรับเทคนิคในการกระตุ้นเซลล์ให้ดีขึ้นด้วยการ co-culture dendritic cells หรือ costimulatory molecules activation หรือใช้ไซโตไคน์บางชนิดเช่น IL-15, IL-23 กระตุ้นเซลล์ CD4+ T cells ร่วมด้วยเพื่อเพิ่มค่าการตรวจวัดได้ดีขึ้น ขณะนี้ยังไม่มียานวิจัยที่ระบุข้อมูลทางเภสัชจลนศาสตร์ของ IL-17 ภายในเซลล์ จึงยังไม่สามารถระบุช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้กระตุ้นเซลล์เพื่อการตอบสนองของ IL-17 ผลการศึกษาในอนาคตจะช่วยให้เข้าใจบทบาทของ IL-17 เพิ่มขึ้น

ผลงานวิจัยนี้ให้ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับ IL-17 expression ใน CD4+ T cells ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูล ซึ่งแม้ว่าจะพบการ up-expression ของ IL-17 ภายในเซลล์หลังกระตุ้นด้วยไมโตเจนแต่ยังขาดการยืนยันด้วยการตรวจวัด IL-17 ด้วยเทคนิคอื่นเช่น mRNA การตรวจ markers ที่บ่งชี้ถึงภาวะ activated CD4+ T cells, subsets ของ T helper cells, death cells รวมไปถึงภาวะ apoptosis นอกจากนี้การตรวจหาความผิดปกติของภูมิคุ้มกันอื่นที่เชื่อมโยงกับ IL-17 expression เช่น neutrophil dysfunction เป็นต้น จะนำไปสู่ประโยชน์ทางคลินิกต่อการดูแลผู้ป่วยในอนาคตได้

การศึกษานี้จึงน่าจะเป็นก้าวแรกที่น่าไปสู่การศึกษาวิจัย IL-17 ในการติดเชื้อเอชไอวีและโรคติดเชื้อเรื้อรังอื่น ๆ ต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Redd SC, Rutherford GWI, Sande MA, Lifson AR, Hadley WK, Facklam RR, et al. The role of human immunodeficiency virus infection in pneumococcal bacteremia in San Francisco residents. **J Infect Dis** 1990;162:1012-17.
2. Gebo KA, Moore RD, Keruly JC, Chaisson RE. Risk factors for pneumococcal disease in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Infect Dis** 1996;173:857-62.
3. Janoff EN, Breiman RF, Daley CL, Hopewell PC. Pneumococcal disease during HIV infection. Epidemiologic, clinical, and immunologic perspectives. **Ann Intern Med** 1992;117:314-24.
4. Abramson JS, Mills EL. Depression of neutrophil function induced by viruses and its role in secondary microbial infection. **Rev Infect Dis** 1988;10:326-41.
5. Murphy PM, Lane C, Fauci AS, Gallin JI. Impairment of neutrophil bactericidal capacity in patients with AIDS. **J Infect Dis** 1988;158:627-30.
6. Estevez ME, Ballart IJ, Diez RA, Planes N, Scaglione C, Sen L. Early defect of phagocytic cell function in subjects at risk for acquired immunodeficiency syndrome. **Scand J Immunol** 1986;24:215-21.
7. Pitrak DL. Neutrophil deficiency and dysfunction in HIV-infected patients. **Am J Health Syst Pharm** 1999;56 Suppl 5:S9-16.
8. Thatte UM, Gangal PS, Kulkarni MR, Anklesaria PS, Kumta NB, Dahanukar SA. Polymorphonuclear and monocyte functions in measles. **J Trop Pediatr** 1991;37:67-70.
9. Anderson R, Sher R, Rabson AR, Koornhof HJ. Defective chemotaxis in measles patients. **S Afr Med J** 1974;48:1819-20.
10. Feldman C. Pneumonia associated with HIV infection. **Curr Opin Infect Dis** 2005;18:165-70.
11. Kawaguchi M, Adachi M, Oda N, Kokubu F, Huang SK. IL-17 cytokine family. **J Allergy Clin Immunol** 2004;114:1265-73.
12. Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. Interleukin-17: a mediator of inflammatory responses. **Cell Mol Life Sci** 2004;61:567-79.

13. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. **J Immunol** 1999;162:1246-51.
14. Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, Lam CW. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clin Exp Immunol** 2001;125:177-83.
15. Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, et al. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factors for IL-17-mediated granulopoiesis. **J Immunol** 2000;164:4783-9.
16. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, et al. Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine, IL-17 which binds to novel cytokine receptor. **Immunity** 1995;3:811-21.
17. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J Exp Med** 1996;183:2593-603.
18. Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. **J Immunol** 1993;150:5445-56.
19. Kennedy J, Rossi DL, Zurawski SW, Vega F Jr, Kastelein RA, Wagner JL, et al. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR+ CD4- CD8- T cells. **J Interferon Cytokine Res** 1996;16:611-7.
20. Yao Z, Timour M, Painter S, Fanslow W, Spriggs M. Complete nucleotide sequence of the mouse CTLA8 gene. **Gene** 1996;168:223-5.
21. Broxmeyer HE. Is interleukin 17, an inducible cytokine that stimulates production of other cytokines, merely a redundant player in a sea of other biomolecules? **J Exp Med** 1996;183:2411-5.
22. Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. **Cell** 1986;46:659-67.
23. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. **J Immunol** 1995;155:5483-6.

24. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. **J Immunol** 2000;165:6107-15.
25. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. **J Invest Dermatol** 2000;115:81-7.
26. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide- induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. **J Immunol** 2003;170:2106-12.
27. Molet S, Hamid Q, Davoine F, Nutku E, Taha R, Page N, et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. **J Allergy Clin Immunol** 2001;108:430-8.
28. Shin HC, Benbernou N, Fekkar H, Esnault S, Guenounou M. Regulation of IL-17, IFN-gamma and IL-10 in human CD8+ T cells by cyclic AMP-dependent signal transduction pathway. **Cytokine** 1998;10:841-50.
29. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J Biol Chem** 2003;278:1910-14.
30. Happel KI, Zheng M, Young E, Quinton LJ, Lockhart E, Ramsay AJ, et al. Roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. **J Immunol** 2003;170:4432-6.
31. Ghilardi N, Kljavin N, Chen Q, Lucas S, Gurney AL, De Sauvage FJ. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23-deficient mice. **J Immunol** 2004;172:2827-33.
32. Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A, et al. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. **J Immunol** 1998;161:6383-9.
33. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lotvall J, Sjostrand M, Gruenert DC, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. **J Immunol** 1999;162:2347-52.

34. Hellings PW, Kasran A, Liu Z, Vandekerckhove P, Wuyts A, Overbergh L, et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2003;28:42-50.
35. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. **Immunity** 2002;17:375-87.
36. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. **Respir Med** 2003;97:726-33.
37. Li H, Chen J, Huang A, Stinson J, Heldens S, Foster J, et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000;97:773-8.
38. Shi Y, Ullrich SJ, Zhang J, Connolly K, Grzegorzewski KJ, Barber MC, et al. A novel cytokine receptor-ligand pair. Identification, molecular characterization, and in vivo immunomodulatory activity. **J Biol Chem** 2000;275:19167-76.
39. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family stimulates cytokine production and inhibits hematopoiesis. **J Immunol** 2002;169:642-6.
40. Kim MR, Manoukian R, Yeh R, Silbiger SM, Danilenko DM, Scully S, et al. Transgenic overexpression of human IL-17E results in eosinophilia, B-lymphocyte hyperplasia, and altered antibody production. **Blood** 2002;100:2330-40.
41. Pan G, French D, Mao W, Maruoka M, Risser P, Lee J, et al. Forced expression of murine IL-17E induces growth retardation, jaundice, a Th2-biased response, and multiorgan inflammation in mice. **J Immunol** 2001;167:6559-67.
42. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. **J Immunol** 2002;169:443-53.
43. Oda N, Canelos PB, Essayan DM, Plunkett BA, Myers AC, Huang SK. Interleukin-17F induces neutrophilic inflammation and amplifies antigen-induced pulmonary allergic response. **Am J Respir Crit Care Med** 2005;171:12-8.

44. Kawaguchi M, Kokubu F, Odaka M, Watanabe S, Suzuki S, Ieki K, et al. Induction of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) by a new cytokine, ML-1 (IL-17F), via Raf I-MEK-ERK pathway. **J Allergy Clin Immunol** 2004;114:444-50.
45. Kawaguchi M, Onuchic LF, Li XD, Essayan DM, Schroeder J, Xiao HQ, et al. Identification of a novel cytokine, ML-1, and its expression in subjects with asthma. **J Immunol** 2001;167:4430-5.
46. Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, et al. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. **Cytokine** 1997;9:794-800.
47. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J Exp Med** 2001;194:519-27.
48. Laan M, Lotvall J, Chung KF, Linden A. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. **Br J Pharmacol** 2001;133:200-6.
49. Kawaguchi M, Kokubu F, Kuga H, Matsukura S, Hoshino H, Ieki K, et al. Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. **J Allergy Clin Immunol** 2001;108:804-9.
50. Subramaniam SV, Cooper RS, Adunyah SE. Evidence for the involvement of JAK/STAT pathway in the signaling mechanism of interleukin-17. **Biochem Biophys Res Commun** 1999;262:14-9.
51. Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 in interleukin 17 signal transduction. **J Exp Med** 2000;191:1233-40.
52. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews** 2003;14:155-174.
53. Miyamoto M, Prause O, Sjostrand M, Laan M, Lotvall J, Linden A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. **J Immunol** 2003;170:4465-72.

54. Andoh A, Takaya H, Makino J, Sato H, Bamba S, Araki Y, et al. Cooperation of interleukin-17 and interferon-gamma on chemokine secretion in human fetal intestinal epithelial cells. **Clin Exp Immunol** 2001;125:56-63.
55. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel- Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **J Immunol** 1998;160:3515-21.
56. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17 induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-KB. **J Biol Chem** 1998;273 :27467-73.
57. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17, TNF- α , and IL-1 β -induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. **J Immunol** 1999;162:5337-44.
58. Andoh A, Fujino S, Bamba S, Araki Y, Okuno T, Bamba T, et al. IL-17 selectively down-regulates TNF-alpha-induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. **J Immunol** 2002;169:1683-7.
59. Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony stimulating factor by human airway epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2002;26:748-53.
60. Laan M, Prause O, Miyamoto M, Sjostrand M, Hytonen AM, Kaneko T, et al. A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. **Eur Respir J** 2003;21:387-93.
61. Kawaguchi M, Onuchic LF, Huang SK. Extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 regulates interleukin (IL)-6 and 8 expression by a novel cytokine, ML-1. **J Biol Chem** 2002;277:15229-32.
62. Kawaguchi M, Kokubu F, Matsukura S, Ieki K, Odaka M, Watanabe S, et al. Induction of C-X-C chemokines, growth-related oncogene (GRO)a expression and ENA-78, by ML-1 (IL-17F) involves activation of Raf1-MEK-ERK1/2 pathway. **J Pharmacol Exp Ther** 2003;307:1213-20.

63. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17 induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF-KB. **J Biol Chem** 1998;273:27467-71.
64. Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. **Arthritis Rheum** 1997;40:1050-3.
65. Antonyasamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. **J Immunol** 1999;162:577-584.
66. Rouse BT, Horohov DW. Immunosuppression in viral infections. **Rev Infect Dis** 1986;8:850-73.
67. Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med** 1983;309:453-8.
68. Smith PD, Ohura K, Masur H, Lane HC, Fauci AS, Wahl SM. Monocyte function in the acquired immune deficiency syndrome. Defective chemotaxis. **J Clin Invest** 1984;74:2121-8.
69. Rook AH, Masur H, Lane HC, Frederick W, Kasahara T, Macher AM, et al. Interleukin 2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J Clin Invest** 1983;72:398-403.
70. Sonnerborg A, Jarstrand C. Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction by neutrophilic granulocytes in patients with HTLV-III infection. **Scand J Infect Dis** 1986;18:101-3.
71. Pizzo PA. Infectious complications in the child with cancer. I. Pathophysiology of the compromised host and the initial evaluation and management of the febrile cancer patient. **J Pediatr** 1981;98:341-54.
72. Report of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop. Pulmonary complications of the acquired immunodeficiency syndrome. Special report. **N Engl J Med** 1984;310:1682-8.
73. Bernstein LJ, Krieger B, Novick B, Sicklick MJ, Rubinstein A. Bacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome of children. **Pediatr Infect Dis** 1985;4:472-5.

74. Oleske J, Minnefor A, Cooper R Jr, Thomas K, dela Cruz A, Ahdieh H, et al. Immune deficiency syndrome in children. **JAMA** 1983;249:2345-9.
75. Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear ad against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*: observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. **J Clin Invest** 1982;69:617-31.
76. Denning DW, Follansbee SE, Scolaro M, Norris S, Edelstein H, Stevens DA. Pulmonary aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med** 1991;324:654-62.
77. Minamoto GY, Barlam TF, Vander Els NJ. Invasive aspergillosis in patients with AIDS. **Clin Infect Dis** 1992;14:66-74.
78. Purcell KJ, Telzak EE, Armstrong D. *Aspergillus* species colonization and invasive disease in patients with AIDS. **Clin Infect Dis** 1992;14:141-8.
79. Valone FH, Payan DG, Abrams DI, Goetzl EJ. Defective polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in homosexual men with persistent lymph node syndrome. **J Infect Dis** 1984;150:267-71.
80. Polsky B, Gold JWM, Whimbey E, Dryjanski J, Brown AE, Schiffman G, Armstrong D. Bacterial pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann Intern Med** 1986;104:38-41.
81. Roilides E, Holmes A, Blake C, Pizzo PA, Walsh TJ. Impairment of neutrophil antifungal activity against hyphae of *Aspergillus fumigatus* in children infected with human immunodeficiency virus. **J Infect Dis** 1993;167:905-11.
82. Nielsen H, Kharazmi A, Faber V. Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome. **Scand J Immunol** 1986;24:291-6.
83. Ellis M, Gupta S, Galant S, Hakim S, VandeVen C, Toy C, Cairo MS. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation. **J Infect Dis** 1988;158:1268-76.
84. Lazzarin A, Foppa CU, Galli M, Mantovani A, Poli G, Franzetti F, et al. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and with lymphadenopathy syndrome. **Clin Exp Immunol** 1986;65:105-11.

85. Ras GJ, Eftychis HA, Anderson R, Vanderwalt I. Mononuclear and polymorphonuclear leukocyte dysfunction in male homosexuals with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **S Afr Med J** 1984;66:806-9.
86. Jovanovic DV, Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Mineau F, Jolicoeur FC, Bendoric M, et al. Stimulation of 92 kD gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 2000;43:1134-44.
87. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory and hematopoietic cytokine produced by the rheumatoid synovium. **Arthritis Rheum** 1999;42:963-70.
88. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J Clin Invest** 1999;103:1345-1352.
89. Hoshino H, Lotvall J, Skoogh BE, Linden A. Neutrophil recruitment by interleukin-17 into rat airways in vivo. role of tachykinins **Am J Respir Crit Care Med** 1999;159:1423-8.
90. Matusiewicz D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Mult Scler** 1999;5:101-4.
91. Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, et al. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. **J Immunol** 2004;173:3482-91.
92. Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. **Annu Rev Immunol** 2004;22:181-215.
93. Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, et al. Many chemokines including CCL20/MIP-3 display antimicrobial activity. **J Leukoc Biol** 2003;74:448-55.
94. Lengel-Janßen B, Strauss AF, Steere AC, Kamradt T. The T helper cell response in Lyme arthritis: differential recognition of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA)

- in patients with treatment-resistant or treatment-responsive Lyme arthritis. **J Exp Med** 1994;180:2069-78.
95. Burmester GR, Daser A, Kamradt T, Krause A, Mitchison NA, Sieper J, et al. Immunology of reactive arthritides. **Annu Rev Immunol** 1995;13:229-250.
96. Chirmule N, Kalyanaraman VS, Oyaizu N, Slade HB, Pahwa S. Inhibition of functional properties of tetanus antigen-specific T-cell clones by envelope glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus. **Blood** 1990;75:152-9.
97. Mann DL, Lasane F, Popovic M, Arthur LO, Robey WG, Blattner WA, et al. HTLV-III large envelope protein(gp120) suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. **J Immunol** 1987;138:2640-4.
98. Kekow U, Wachsmann W, McCutchan JA, Cronin M, Carson DA, Lotz M. Transforming growth factor β and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990;87:8321-5.
99. Abramson SL, Gallin JI. IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. **J Immunol** 1990;144:625-30.
100. Shearer GM, Clerici M. T helper cell immune dysfunction in asymptomatic HIV-1 seropositive individuals: the role of TH1-TH2 cross-regulation. **Chem Immunol** 1992;54:21-43.
101. Murray HW, Rubin B, Masur H, Roberts RB. Impaired production of lymphokines and immune(gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med** 1984;310:883-9.
102. Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, Decarlo ES, Melnick DA. In vivo interferon γ therapy augments the in vitro ability of chronic granulomatous disease neutrophils to damage *Aspergillus hyphae*. **J Infect Dis** 1991;163:849-52.
103. Pala P, Hussell T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. **J Immunol Methods** 2000;243:107-24.
104. Sander B, Andersson J, Andersson U. Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. **Immuno Rev** 1991;119:65-93.
105. Schmitz J, Assenmacher M, Radbruch A. Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. **Eur J Immunol** 1993;23:191-9.

106. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. **J Immunol Methods** 1993;159:197-207.
107. Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, Maino V, Davis K, Murphy K, O'Garra A. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. **J Exp Med** 1995;182:1357-67.
108. Pelchen-Matthews A, Parsons IJ, Marsh M. Phorbol ester induced downregulation of CD4 is a multistep process involving dissociation from p56lck, increased association with clathrin-coated pits, and altered endosomal sorting. **J Exp Med** 1993;178:1209-22.
109. Petersen CM, Christensen EI, Andresen BS, Moller BK. Internalization, lysosomal degradation and new synthesis of surface membrane CD4 in phorbol ester-activated T-lymphocytes and U-937 cells. **Exp Cell Res** 1992;201:160-73.
110. Ruegg CL, Rajasekar S, Stein BS, Engleman EG. Degradation of CD4 following phorbol-induced internalization in human T lymphocytes. Evidence for distinct endocytic routing of CD4 and CD3. **J Biol Chem** 1992;267:18837-43.
111. Telerman A, Amson RB, Romasco F, Wybran J, Galand P, Mosselmans R. Internalization of human T lymphocyte receptors. **Eur J Immunol** 1987;17:991-7.
112. Nakayama K, Nakauchi H. Cyclosporin A inhibits the decrease of CD4/CD8 expression induced by protein kinase C activation. **Int Immunol** 1993;5:419-26.
113. Andersson J, Abrams J, Bjork L, Funa K, Litton M, Agren K, Andersson U. Concomitant in vivo production of 19 different cytokines in human tonsils. **Immunology** 1994;83:16-24.
114. Assenmacher M, Scheffold A, Schmitz J, Segura Checa JA, Miltenyi S, Radbruch A. Specific expression of surface interferon-gamma on interferon-gamma producing T cells from mouse and man. **Eur J Immunol** 1996;26:263-7.
115. Lenarczyk A, Helsloot J, Farmer K, Peters L, Sturgess A, Kirkham B. Antigen-induced IL-17 response in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy controls. **Clin Exp Immunol** 2000;122:41-8.
116. Eylar EH, Lefranc CE, Yamamura Y, Baez I, Colon-Martinez SL, Rodriguez N, Breithaupt TB. HIV infection and aging: enhanced Interferon- and Tumor Necrosis Factor-alpha production by the CD8+ CD28- T subset. **BMC Immunol** 2001;2:10.

117. Dugue B, Leppanen E, Grasbeck R. Preanalytical factors and the measurement of cytokines in human subjects. **Int J Clin Lab Res** 1996;26:99–105.
118. Wadhwa M, Thorpe R. Cytokine immunoassays: recommendations for standardisation, calibration and validation. **J Immunol Methods** 1998;219:1–5.
119. Sullivan KE, Cutilli J, Piliero LM, Ghavimi-Alagha D, Starr SE, Campbell DE, Douglas SD. Measurement of cytokine secretion, intracellular protein expression, and mRNA in resting and stimulated peripheral blood mononuclear cells. **Clin Diagn Lab Immunol** 2000;7:920-24.
120. Mahalingam M, Peakman M, Davies ET, Pozniak A, McManus TJ, Vergani D. T cell activation and disease severity in HIV infection. **Clin Exp Immunol** 1993;93:337-43.
121. Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. **J Immunol** 1998;161:482-8.
122. Sukwit S, Chuenchitra T, Samakoses R, Sungprasum K, Aree C, Akapirat S, et al. Flow cytometric detection of intracellular cytokines in peripheral blood of HIV-1 infected Thai Children. **Asian Pac J Allergy Immunol** 2001;19:107-13.
123. North ME, Ivory K, Funauchi M, et al. Intracellular cytokine production by human CD4+ and CD8+ T cell from normal and immunodeficient donors using directly conjugated anti-cytokine antibodies and three-colour flow cytometry. **Clin Exp Immunol** 1996;105:517-22.
124. Prince HE, Czaplicki CD. In vitro activation of T lymphocytes from HIV-seropositive blood donors. **Clin Immunol Immunopathol** 1988;48:132-9.
125. Ziegler-Heitbrock HWL, Stachel D, Schlunk T, et al. Class II (DR) antigen expression on CD8+ lymphocyte subsets in AIDS. **J Clin Immunol** 1988;8:473-78.
126. Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, et al. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in HIV syndrome: staging and prognostic value. **Clin Exp Immunol** 1992;90:376-82.

127. Jahoor F., Gazzard B., Phillips G., Sharpstone D, Delrosario M, Frazer ME, et al. The acute-phase protein response to human immunodeficiency virus infection in human subjects. **Am J Physiol** 1999;276:E1092-8.
128. Treitinger A, Spada C, da Silva LM, Hermes EM, Amaral JA, Parra Abdalla DS. Lipid and Acute-Phase Protein Alterations in HIV-1 Infected Patients in the Early Stages of Infection: Correlation with CD4+ Lymphocytes. **Braz J Infect Dis** 2001;5:192-9.
129. Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. **Immunol Rev** 1992;127:25-50.
130. Barcellini W, Rizzardì GP, Borghi MO, Fain C, Lazzarin A, Meroni PL. TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients. **AIDS** 1994;8:757-62.
131. Wigmore S.J., Featon K.H.C., Maingay J.P. Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. **Am J Physiol** 1997;273:E720-6.
132. Maggi E, Mazzetti M, Ravina A, Annunziato F, de Carli M, Paccinni MP, et al. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. **Science** 1994;265:244-8.
133. Romagnani S, Maggi E, del Prete G. An alternative view of the Th1/Th2 switch hypothesis in HIV infection. **AIDS Res Hum Retroviruses** 1994;10:iii-ix.
134. Meyaard L, Hovenkamp E, Keet IPM, Hooibrink B, de Jong IH, Otto SA, Miedema F. Single-cell analysis of IL-4 and IFN- γ production by T cells from HIV-infected individuals. **J Immunol** 1996;157:2712-18.
135. Kallas EG, Gibbons DC, Soucier H, Fitzgerald T, Treanor JJ, Evans TG. Detection of intracellular antigen-specific cytokines in human T cell populations. **J Infect Dis** 1999;179:1124-31.
136. Hyjek E, Lischner HW, Hyslop T, Bartkowiak J, Kubin M, Trinchieri G, Kozbor D. Cytokine patterns during progression to AIDS in children with perinatal HIV infection. **J Immunol** 1995;155:4060-71.
137. Piasecki E, Ledwon TK, Inglot AD, Knysz B, Simon K, Inglot M, Gladysz A. Interferon and tumor necrosis factor responses of HIV+ patients as markers for monitoring of the AIDS progression. **Arch Immunol Ther Exp** 1994;42:439-45.

138. Gomez MJ, Torosantucci A, Quinti I, Testa U, Peschle C, Cassone A. Mannoprotein-induced anti-U937 cell cytotoxicity in peripheral blood mononuclear cells from uninfected or HIV-infected subjects: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **Cell Immunol** 1993;152:530-43.
139. Poli G, Biswas P, Fauci AS. Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. **Antiviral Res** 1994;24:221-33.
140. Onlamoon N, Pattanapanyasat K, Ansari AA. Impaired IFN-gamma production by viral immunodominant peptide-specific tetramer+ CD8+ T cells in HIV-1 infected patients is not secondary to HAART. **Clin Dev Immunol** 2004;11:287-98.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย (Consent Form)

เรื่อง ความแตกต่างของการสร้างอินเตอร์ลิวคิน 17 ภายในเม็ดเลือดขาวซีดี 4 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย ไมโตเจน ในหลอดทดลองของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี (THE DIFFERENCES OF IN VITRO MITOGEN STIMULATED INTRACELLULAR IL-17 EXPRESSION OF CD4+ T CELLS FROM HIV INFECTED PATIENTS AND HIV SERONEGATIVE HEALTHY DONORS)

ผู้รับผิดชอบโครงการวิจัยนี้คือ นายแพทย์วิรัช เมฆอนันต์ธวัช ซึ่งคุณสามารถติดต่อได้ที่ หน่วยภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม4 กรุงเทพฯ 10330 เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4152

วัตถุประสงค์งานวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในด้านความรู้พื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันในอาสาสมัครปกติและผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วยเซลล์ที่มีความจำเพาะในการทำลายเชื้อโรค ป้องกันร่างกายและต่อสู้กับโรค นอกจากนี้ยังสื่อสารกันด้วยการหลั่งสารหลายชนิด เพื่อให้สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ หนึ่งในสารนี้คือ สารอินเตอร์ลิวคิน 17 หรือจะย่อด้วยสัญลักษณ์ต่อไปนี้ว่า IL-17 ซึ่งเป็นสารไกลโคโปรตีนที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวซีดี 4 และเป็นสารที่กำลังตรวจหาในการศึกษานี้ ขณะที่โรคเอดส์ดำเนินไปนั้นพบว่าระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยจะสามารถต่อสู้กับเชื้อไวรัสได้น้อยลง และมีความเสี่ยงในการติดเชื้อโรคฉวยต่าง ๆ ได้ง่าย สาร IL-17 มีบทบาทสำคัญในกลไกการอักเสบและการทำงานของเม็ดเลือดขาวต่อการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เมื่อระดับเม็ดเลือดซีดี 4 ลดต่ำลงจึงน่าจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ IL-17 อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสารนี้ทั้งในประชากรปกติและผู้ติดเชื้อเอชไอวี น้อยมาก การศึกษานี้จึงดำเนินการขึ้นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สำคัญดังกล่าว เพื่อความเข้าใจกลไกทางภูมิคุ้มกันและอาจนำมาสู่การนำไปใช้เป็นตัวแปรที่สำคัญในการติดตามผู้ติดเชื้อเอชไอวี หรือโรคในกลุ่มภูมิคุ้มกันอื่น ในอนาคตต่อไป

ในการเข้าร่วมโครงการนี้ คุณจึงต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหนึ่งในสองกลุ่มดังต่อไปนี้

1. คุณต้องมีสุขภาพแข็งแรง ไม่ติดเชื้อเอชไอวี และเลือดของคุณจะนำไปใช้ในการศึกษาในกลุ่มควบคุม
2. คุณเป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี

เลือดของคุณอาจถูกนำไปตรวจทางห้องปฏิบัติการต่อไปนี้

- การตรวจเม็ดเลือดสมบูรณ์
- การตรวจน้ำตาลในเลือด
- การตรวจหน้าที่ของตับ ไต
- การตรวจการติดเชื้อเอชไอวีซ้ำในกรณีที่คุณเป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี
- การตรวจระดับเม็ดเลือดซีดี 4 และซีดี 8
- การตรวจระดับไวรัสเอชไอวีในเลือดในกรณีที่คุณเป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี

ส่วนการส่งตรวจหาระดับสาร IL-17 มีวัตถุประสงค์ในงานวิจัยเท่านั้นจึงจะไม่แจ้งผลการตรวจนี้แก่คุณ เนื่องจากผลดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับการดูแลทางคลินิกจากแพทย์ประจำของคุณ

กระบวนการในการศึกษา

หนังสือยินยอมฉบับนี้จะให้ข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาโดยสังเขปแก่คุณ คุณสามารถสอบถามรายละเอียดเกี่ยวกับโครงการจากแพทย์ผู้ดูแลโครงการและเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องได้ เมื่อคุณเข้าใจและยินยอมเห็นด้วยในการเข้าร่วมการศึกษา คุณจะต้องลงนามทำหนังสือยินยอมนี้เพื่อแสดงความยินดีในการเข้าร่วมโครงการ และจะได้รับสำเนาหนังสือนี้เก็บไว้เป็นหลักฐาน เพื่อแสดงว่าการลงนามนี้เป็นไปด้วยความเต็มใจสมัครใจ คุณสามารถถอนตัวจากการเข้าร่วมการศึกษานี้ได้ตลอดเวลาโดยไม่สูญเสียสิทธิในการได้รับดูแลรักษาพยาบาลตามปกติ

หลังจากยินยอมเข้าร่วมการศึกษาด้วยการลงนามในหนังสือฉบับนี้แล้ว คุณจะได้รับการเจาะเลือดปริมาณ 25-30 ซีซี (ประมาณ 2 ช้อนโต๊ะ) บริเวณแขน ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะถูกทำความสะอาดและใช้เข็มแทงผ่านหลอดเลือดดำ เลือดของคุณจะถูกเก็บไว้ในหลอดเลือดพิเศษ ผู้วิจัยอาจต้องการเลือดของคุณเพิ่มเติมจากที่ระบุไว้ได้ ซึ่งต้องได้รับความยินยอมจากคุณก่อนด้วยการติดต่อจากแพทย์หรือเจ้าหน้าที่ประจำโครงการ คุณจะมีอิสระในการตัดสินใจในการปฏิเสธการร้องขอนี้ได้ อย่างไรก็ตาม ใดก็ตามถ้าคุณยินยอม เลือดของคุณปริมาณน้อยกว่า 10 ซีซี (น้อยกว่า 1 ช้อนโต๊ะ) การเข้าร่วมการศึกษายังเป็นไปด้วยความสมัครใจ คุณจึงสามารถถอนตัวได้ทุกเวลา

การจัดเก็บข้อมูล

ข้อมูลทางห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างเลือดของคุณจะถูกส่งไปยังห้องปฏิบัติการของหน่วยภูมิแพ้และภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเตรียมนำไปใช้ต่อไป ข้อมูลที่จัดเก็บจะเป็นข้อมูลทางห้องปฏิบัติการเท่านั้น ไม่มีข้อมูลส่วนตัวของคุณ เช่นชื่อ ที่อยู่ เป็นต้น ข้อมูลทั้งหมดจะถูกตั้งรหัสด้วยตัวเลขและเก็บไว้ในที่ที่ปลอดภัย จึงไม่มีชื่อของคุณในบันทึกข้อมูล สำหรับข้อมูลส่วนตัวของคุณจะถูกเก็บแยกไว้ในแฟ้มอาสาสมัครของโครงการไว้กับแพทย์ผู้ดูแลโครงการเท่านั้น การวิเคราะห์และนำเสนอข้อมูลจะใช้รหัสในการเข้าร่วมโครงการของคุณในการป้อนข้อมูลและเสนอเป็นกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่แสดงข้อมูลที่บ่งชี้ว่ามาจากอาสาสมัครท่านใด

การเก็บตัวอย่างเลือด

ตัวอย่างเลือดของคุณจะเก็บแช่แข็งไว้ในห้องปฏิบัติการดังกล่าวสำหรับการตรวจทางภูมิคุ้มกันในอนาคตเพื่องานวิจัยเท่านั้น โดยจะไม่ถูกใช้หรือขายเพื่อผลิตผลทางการค้าโดยตรง ตัวอย่างเลือดจะใช้รหัสตัวเลขจึงไม่มีชื่อของคุณถูกระบุไว้ ผลงานวิจัยในอนาคตที่ได้จากตัวอย่างเลือดของคุณอาจถูกนำเสนอในรูปแบบงานตีพิมพ์และงานประชุมทางวิชาการโดยไม่ระบุชื่อของคุณในฐานะผู้ร่วมโครงการวิจัย นอกจากนี้เซลล์ในเลือดของคุณจะได้รับการเพาะเลี้ยงให้เจริญได้โดยไม่ต้อง จึงสามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่องได้หรือเก็บแช่แข็งไว้เพื่อการเพาะเลี้ยงในอนาคตต่อไปได้อีกหลายปี

ความเสี่ยงและความไม่สบายจากการเข้าร่วมโครงการ

การเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดอาจทำให้เกิดรอยเขียวช้ำ หรือเลือดออกจากบริเวณที่เข็มแทง บางครั้งอาจรู้สึกเวียนศีรษะ ทรงตัวไม่ดีหรือเป็นลมได้ขณะเจาะเลือด มีโอกาสน้อยมากที่จะเกิดการติดเชื้อจากการเจาะเลือดซึ่งคุณจะได้รับ การดูแลรักษาโดยไม่เสียค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงในการเกิดภาวะซีด (ปริมาณเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าปกติ) อาการและอาการแสดงของภาวะซีด ได้แก่ คลื่นไส้ ปวดหัว อ่อนเพลีย อย่างไรก็ตามการเข้าร่วมโครงการนี้คุณจะถูกเจาะเลือดเพียงครั้งเดียว ยกเว้นกรณีจำเป็นที่ต้องร้องขอจากคุณเป็นกรณีไป จึงไม่ควรเกิดปัญหาดังกล่าว และถือเป็นการตรวจนับเม็ดเลือดเพื่อติดตามภาวะซีดซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการดูแลสุขภาพของคุณระหว่างการติดตามการรักษาเช่นกัน

กรณีที่คุณเข้าร่วมโครงการในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ติดเชื้อเอชไอวี นอกจากผลการตรวจเลือด เช่นเดียวกับการตรวจร่างกายประจำปีซึ่งจะรายงานผลกับคุณแล้ว การตรวจทางห้องปฏิบัติการบางอย่างกับตัวอย่างเลือดของคุณเพื่อเป็นข้อมูลของงานวิจัยจึงเป็นไปได้ว่าจะตรวจพบการติดเชื้อเอชไอวีของคุณได้ระหว่างเข้าร่วมโครงการนี้

ประโยชน์ในการเข้าร่วมโครงการนี้

คุณจะไม่ได้รับประโยชน์ในการเข้าร่วมงานวิจัยนี้โดยตรง นอกจากได้ทราบผลการตรวจสุขภาพที่เกี่ยวข้องกับโครงการนี้ ไม่มีค่าตอบแทนให้สำหรับการเจาะเลือด อย่างไรก็ตามเป็นไปได้ว่าผลจากการศึกษาวิจัยนี้อาจนำมาใช้ช่วยพัฒนาความรู้เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันและอาจนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อเอชไอวี และโรคภูมิคุ้มกันอื่น แม้ว่าจะไม่สามารถให้สัญญาได้ว่าประโยชน์นี้จะเกิดขึ้นก็ตาม

ทางเลือกของคุณ

การตัดสินใจของคุณในการเข้าร่วมโครงการนี้เป็นไปด้วยความสมัครใจทั้งสิ้น ทางเลือกที่เหลือคือการตัดสินใจไม่เข้าร่วมโครงการ

การยินยอมยินดีเข้าร่วมโครงการ

ข้าพเจ้า _____ อายุ _____ ปี ได้ทราบข้อมูลของโครงการวิจัยนี้อย่างละเอียด ซึ่งผู้ดำเนินการวิจัยได้อธิบายตอบข้อสงสัยของข้าพเจ้าจนเข้าใจการดำเนินโครงการอย่างดี และยินดีเข้าร่วมโครงการนี้โดยยินยอมให้เจาะเลือดตามที่ระบุไว้ในรายละเอียดข้างต้น

ลงชื่อ _____ อาสาสมัคร

วันที่ลงนาม _____

ข้าพเจ้าได้อธิบายวัตถุประสงค์ของโครงการ กระบวนการวิจัย สิ่งที่น่าสนใจศึกษาวิจัย ความ
เสี่ยงและความไม่สบายที่เกิดขึ้นได้ขณะเข้าร่วมการศึกษา ประโยชน์จากการศึกษาวิจัย ข้าพเจ้ายังได้ตอบ
คำถามของอาสาสมัครที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยอย่างเต็มความสามารถแล้ว

_____ ผู้วิจัยหรือผู้แทน
วันที่ลงนาม _____

_____ พยาน (ถ้ามี)
วันที่ลงนาม _____



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

แบบสอบถาม

แบบสอบถามนี้เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยเรื่อง ความแตกต่างของการสร้างอินเทอร์เน็ตลิวคิน 17 ภายในมีด เลือดขาวซีดี 4 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโทเจนในหลอดทดลองของผู้ติดเชื้อเอชไอวีและอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่ ติดเชื้อเอชไอวี ข้อมูลของท่านจะได้รับการปกปิดเป็นความลับอย่างดี และ ในการวิเคราะห์ผลจะใช้ รหัสแทนชื่อของท่าน ผลการวิจัยจะนำเสนอในลักษณะเป็นกลุ่มอาสาสมัครโดยไม่เปิดเผยชื่อผู้ตอบ ในทุกกรณี

หมวดที่ 1 ข้อมูลของอาสาสมัคร

เลขที่ _____

ID

1 3

I ข้อมูลส่วนตัว

1. เลขประจำตัวคนไข้นอก (HN) _____

HN

4 10

2. เพศ _____ 1. ชาย _____ 2. หญิง _____

SEX

11

3. อายุ _____ ปี (จำนวนเต็มปี)

AGE

12 13

4. วุฒิการศึกษาสูงสุด _____ 1. ต่ำกว่ามัธยมศึกษา _____ 2. มัธยมศึกษา _____

EDU

_____ 3. ปริญญาตรี _____ 4. สูงกว่าปริญญาตรี 14

_____ 5. อื่น ๆ ระบุ _____

5. ภูมิลำเนาปัจจุบัน _____ 1. กรุงเทพฯและปริมณฑล _____ 2. ภาคกลาง _____

RES

_____ 3. ภาคเหนือ _____ 4. ภาคอีสาน 15

_____ 5. ภาคตะวันออก _____ 6. ภาคใต้

_____ 7. อื่น ๆ _____

6. สถานะภาพสมรส _____ 1. โสด _____ 2. สมรส _____

MAR

_____ 3. หม้าย _____ 4. แยกทาง 16

_____ 5. อื่น ๆ _____

7. อาชีพ	_____ 1. รับจ้าง	_____ 2. รับราชการ	OCC	
	_____ 3. รัฐวิสาหกิจ	_____ 4. ธุรกิจส่วนตัว	17	
	_____ 5. อื่น ๆ _____			
8. รายได้ต่อเดือน	_____ บาท		SAL	
			18	22

II ข้อมูลสุขภาพ

1. ขณะนี้ท่านมีอาการผิดปกติเหล่านี้หรือไม่ (กรุณาตอบทุกข้อ)			PRE	
1.1. ไข้	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P1	23
1.2. ไอ	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P2	24
1.3. เสมหะ	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P3	25
1.4. หอบ	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P4	26
1.5. ฝืนอง	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P5	27
1.6. ปวดหัว	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P6	28
1.7. ปวดเมื่อย ครั่นเนื้อครั่นตัว	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P7	29
1.8. อื่น ๆ ระบุ _____	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P8	30
ระบุ _____	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	P9	31
2. ในอดีตท่านเคยมีอาการผิดปกติเหล่านี้หรือไม่ (กรุณาตอบทุกข้อ)			PAS	
2.1. โรคปอดบวม ปอดอักเสบ	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	A1	32
2.2. ไชน์สอักเสบ	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	A2	33
2.3. ไข้เยื่อหุ้มสมองอักเสบ	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	A3	34
2.4. ฝืนอง ระบุบริเวณ _____	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	A4	35
2.5. การติดเชื้ออื่น ๆ ระบุ _____	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	A5	36
3. จำนวนครั้งของการติดเชื้อในข้อ 2. ที่มีประวัติบ่อยที่สุด				
ระบุ _____ ว่ามีความถี่อย่างไร				
_____ 1. มากกว่า 5 ครั้ง	_____ 2. 3-5 ครั้ง	_____ 3. 1-2 ครั้ง	A6	37
4. ขณะนี้ยาที่กินประจำหรือไม่	_____ 1.ใช่	_____ 2. ไม่ใช่	A7	38
ถ้าใช่ โปรดระบุ ชื่อยา และขนาดยาที่ใช้				

5. ประวัติแพ้ยา _____ 1.เคย _____ 2. ไม่เคย	A8	
ถ้าใช่ โปรดระบุ ชื่อยาที่แพ้ _____		39
<hr/>		
6. ประวัติการได้รับวัคซีนที่ผ่านมา _____ 1.เคย _____ 2. ไม่เคย	A9	
เลือกวัคซีนที่ได้รับ (ได้มากกว่าหนึ่งข้อ) ระบุปีที่ได้รับวัคซีน(ถ้าจำได้)		40
_____ วัคซีนบาดทะยัก เมื่อ _____	A10	41
_____ วัคซีนนิวโมคอคคัสเมื่อ _____	A11	42
_____ วัคซีนวัณโรค เมื่อ _____	A12	43
_____ วัคซีนพิษสุนัขบ้า เมื่อ _____	A13	44
_____ วัคซีนไขหัดเมื่อ _____	A14	45
_____ วัคซีนไขกาฬหลังแอ่นเมื่อ _____	A15	46
_____ วัคซีน _____ เมื่อ _____	A16	47
7. ท่านเคยตรวจเลือดเพื่อดูการติดเชื้อเอชไอวีหรือไม่	A17	
_____ 1.เคย _____ 2. ไม่เคย(ถ้าตอบว่าไม่เคย สิ้นสุดแบบสอบถาม)		48
8. ผลการตรวจเลือดเอชไอวีล่าสุดพบเลือดบวกหรือไม่	A18	
ระบุวันเวลาที่ตรวจ _____		49
_____ 1.บวก _____ 2. ไม่บวก(ถ้าตอบว่าไม่บวก สิ้นสุดแบบสอบถาม)		
9. เหตุผลที่ทำให้ต้องตรวจเลือดเอชไอวี _____		

III ข้อมูลการติดเชื้อเอชไอวี

1. ท่านคิดว่าท่านได้รับเชื้อเอชไอวีจากช่องทางใด	H1	
_____ 1. เพศสัมพันธ์ _____ 2. เข็มฉีดยา _____ 3. เลือด _____ 4. อื่น ๆ ระบุ _____		50
2. ชนิดของเพศสัมพันธ์ที่ท่านเคยปฏิบัติก่อนทราบผลเลือดคือแบบใด	H2	
_____ 1. ต่างเพศ _____ 2. สองเพศ _____ 3. เพศเดียวกัน _____ 4. อื่น ๆ ระบุ _____		51
3. ชนิดของเพศสัมพันธ์ที่ท่านปฏิบัติขณะนี้เป็นแบบใด	H3	
_____ 1. ต่างเพศ _____ 2. สองเพศ _____ 3. เพศเดียวกัน _____ 4. อื่น ๆ ระบุ _____		52
4. ท่านเคยติดเชื้อโรคฉวยโอกาสดังต่อไปนี้หรือไม่		
4.1 วัณโรคปอดหรือวัณโรคที่อวัยวะอื่น _____ 1.ใช่ _____ 2. ไม่ใช่	H4	53
4.2 เชื้อราในปอดหรือ PCP _____ 1.ใช่ _____ 2. ไม่ใช่	H5	54

- 4.3 เชื้อราในสมอง ระบุ _____ 1.ใช่ _____ 2. ไม่ใช่ **H6** 55
- 4.4 อื่น ๆ ระบุ _____ 1.ใช่ _____ 2. ไม่ใช่ **H7** 56
5. ระดับเม็ดเลือดขาว CD4 ต่ำสุด คือ _____ ต่อซีซี เมื่อ ___/___/___ **H8** 57-59
6. ระดับไวรัสเอชไอวีในเลือดต่ำสุดคือ _____ ต่อซีซี เมื่อ ___/___/___ **H9** 60-66
7. ขณะนี้ท่านรับการรักษาคด้วยยาต้านเชื้อไวรัส _____ 1.ใช่ _____ 2.ไม่ใช่ **H10** 67
8. ระบุสูตรยาที่ได้และระยะเวลาในการรักษาในแต่ละสูตร(ระบุเป็นสัปดาห์)

สรุปผลการตรวจร่างกายและระบุความผิดปกติที่พบในอาสาสมัคร
ผลการตรวจร่างกาย

:

หมวดที่ 2 ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการของอาสาสมัคร

1. antiHIV 1. positive 2. negative
2. CBC: Hb _____ g/dL Hct _____ %
WBC _____ /mL PMN _____ % absolute neutrophils _____
L _____ % Mono _____ % Eo _____ % Plt _____ /mL
3. CD4 : absolute _____ % _____
4. CD8 : absolute _____ % _____ CD4/CD8 ratio _____
5. CD3 : absolute _____
6. VL : _____ log _____
7. PG: _____ Cr _____
8. SGOT _____ SGPT _____ AL _____
9. UA: _____
10. IL-17: level _____ antigen stimulation by _____
IL-17: level _____ antigen stimulation by _____
IL-17: level _____ antigen stimulation by _____
IL-17: level _____ antigen stimulation by _____

IL-17: level _____ antigen stimulation by _____

IL-17: level _____ antigen stimulation by _____

11. IFN- γ : level _____ antigen stimulation by _____

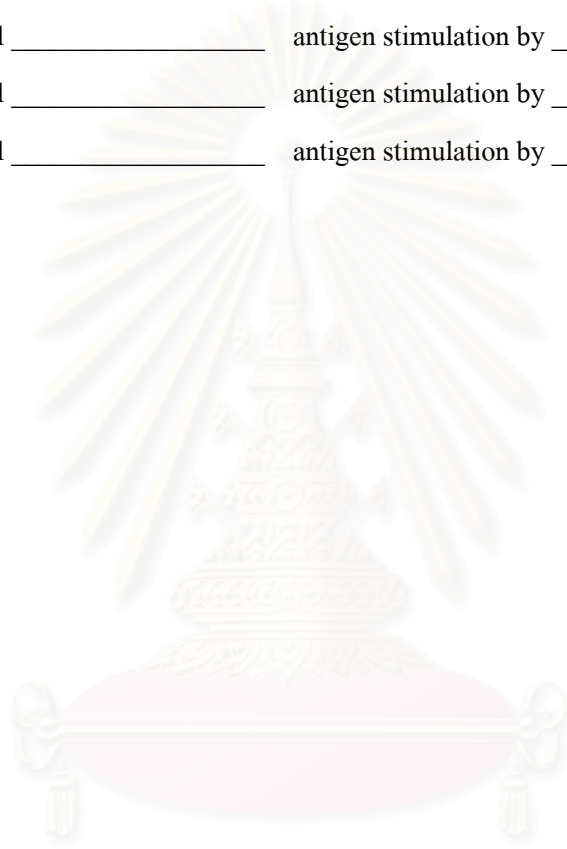
IFN- γ : level _____ antigen stimulation by _____

IFN- γ : level _____ antigen stimulation by _____

IFN- γ : level _____ antigen stimulation by _____

IFN- γ : level _____ antigen stimulation by _____

IFN- γ : level _____ antigen stimulation by _____



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คู่มือการลงทะเบียนแบบสอบถาม Protocol IL-17-01

ชุดคำถาม	ข้อที่	ชื่อตัวแปร	หัวข้อเรื่อง	คอลัมน์	จำนวนคอลัมน์	รายละเอียด
1		ID	เลขที่แบบสอบถาม	1-3	3	เลขที่แบบสอบถาม 001-999
	1	HN	เลขผู้ป่วยนอกในปี25XX	4-10	7	เลขที่ผู้ป่วยนอกของรพ.00001XX-99999XX
	2	SEX	เพศ	11	1	รหัสตามแบบสอบถาม 1 = เพศชาย 2 = เพศหญิง
	3	AGE	อายุ	12-13	1	ลงอายุเต็ม หน่วยปี 99 = ไม่ตอบ
	4	EDU	วุฒิการศึกษา	14	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	5	RES	ภูมิลำเนา	15	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	6	MAR	สถานะสมรส	16	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	7	OCC	อาชีพ	17	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	8	SAL	เงินเดือน	18-22	5	ใส่จำนวนเงินเดือน(บาท) ถ้าไม่ตอบ =99999
2	1	PRE	อาการปัจจุบัน			
	1.1	P1	ไข้	23	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	1.2	P2	ไอ	24	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	1.3	P3	เสมหะ	25	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	1.4	P4	หอบ	26	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	1.5	P5	ผีหลอก	27	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	1.6	P6	ปวดหัว	28	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	1.7	P7	ปวดเมื่อย กล้ามเนื้อตัว	29	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	1.8	P8	ระบออาการ	30	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ถ้าไม่ระบออาการใส่ 9
	1.9	P9	ระบออาการ	31	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ถ้าไม่ระบออาการใส่ 9
	2.1	A1	โรคปอดบวม	32	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
	2.2	A2	ไซนัสอักเสบ	33	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม

ชุดคำถาม	ข้อที่	ชื่อตัวแปร	หัวข้อเรื่อง	คอลัมน์	จำนวนคอลัมน์	รายละเอียด	
2 (ต่อ)	2.3	A3	ไข้เชื้อหุ้มสมองอักเสบ	34	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม	
	2.4	A4	ผีหนอง	35	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม	
	2.5	A5	ระบบการติดเชื้อ	36	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ถ้าไม่ระบุไว้ให้ใส่ 9	
	3	A6	จำนวนครั้ง	37	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม	
	4	A7	ประวัติยาที่ใช้ในปัจจุบัน	38	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม	
	5	A8	ประวัติแพ้ยา	39	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม	
	6	A9	ประวัติวัคซีน	40	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม	
		A10	วัคซีนบาดทะยัก	41	1	ใส่รหัส 1 เมื่อกาข้อมูล ใส่รหัส 0 เมื่อ ไม่กา	
		A11	วัคซีน นิวโมคอคคัส	42	1	ใส่รหัส 1 เมื่อกาข้อมูล ใส่รหัส 0 เมื่อ ไม่กา	
		A12	วัคซีนวัณโรค	43	1	ใส่รหัส 1 เมื่อกาข้อมูล ใส่รหัส 0 เมื่อ ไม่กา	
		A13	วัคซีน พิษสุนัขบ้า	44	1	ใส่รหัส 1 เมื่อกาข้อมูล ใส่รหัส 0 เมื่อ ไม่กา	
		A14	วัคซีนไข้เหลือง	45	1	ใส่รหัส 1 เมื่อกาข้อมูล ใส่รหัส 0 เมื่อ ไม่กา	
		A15	วัคซีน ไข้กาพหลังแอน	46	1	ใส่รหัส 1 เมื่อกาข้อมูล ใส่รหัส 0 เมื่อ ไม่กา	
		A16	ระบุวัคซีน	47	1	ใส่รหัส 1 เมื่อกาข้อมูล ใส่รหัส 0 เมื่อ ไม่กา ใส่รหัส 9 เมื่อ ไม่มีข้อมูล	
		7	A17	การตรวจ HIV	48	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม
		8	A18	ผลตรวจ HIV	49	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ใส่รหัส 9 เมื่อ ไม่มีข้อมูล
	3	1	H1	ช่องทางการติดเชื้อ HIV	50	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ใส่รหัส 9 เมื่อ ไม่มีข้อมูล
		2	H2	รสนิยมทางเพศ	51	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม

ชุดคำถาม	ข้อที่	ชื่อตัวแปร	หัวข้อเรื่อง	คอลัมน์	จำนวนคอลัมน์	รายละเอียด
3	2 (ต่อ)	H2 (ต่อ)				ใส่รหัส 9 เมื่อไม่มีข้อมูล
	3	H3	ลักษณะเพศสัมพันธ์หลังติดเชื้อ	52	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ใส่รหัส 9 เมื่อไม่มีข้อมูล
	4.1	H4	วัณโรค	53	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ใส่รหัส 9 เมื่อไม่มีข้อมูล
	4.2	H5	เชื้อราในปอด	54	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ใส่รหัส 9 เมื่อไม่มีข้อมูล
	4.3	H6	เชื้อราในสมอง	55	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ใส่รหัส 9 เมื่อไม่มีข้อมูล
	4.4	H7	ระบุเชื้อฉกฉวยโอกาส	56	1	ใส่รหัสตามแบบสอบถาม ใส่รหัส 9 เมื่อไม่มีข้อมูล
	5	H8	ระดับเม็ดเลือด CD4	57-59	3	ใส่จำนวนตามผลจริงถ้าไม่มีข้อมูลใส่ 999
	6	H9	ระดับ viral load ในเลือด	60-66	7	ใส่จำนวนตามผลจริง เช่น 105,000 ให้ใส่ 0105000 เป็นต้น ถ้าไม่มีข้อมูลให้ใส่ 9999999

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย วิรัช เมฆอนันต์ธวัช เกิดวันที่ 12 กันยายน 2514 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีแพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2537 ได้รับประกาศนียบัตรทนายศาสตร์ทางการแพทย์คลินิก (สาขาอายุรศาสตร์) ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาอายุรศาสตร์) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2546



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย