

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดทีเซลล์ต่อเชื้อไวรัสเอชไอวีในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัส  
ตับอักเสบบี



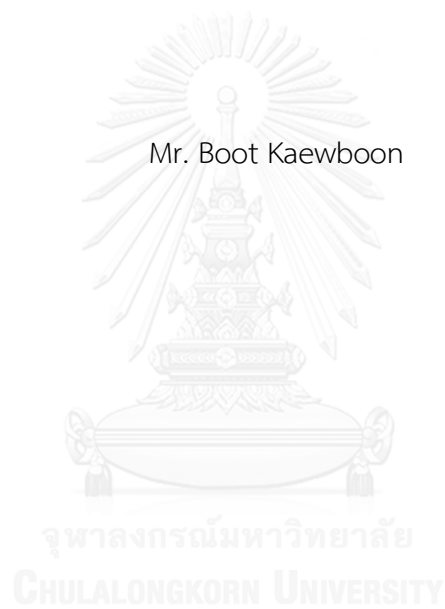
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์  
การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2557  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HIV SPECIFIC T LYMPHOCYTE RESPONSES IN HIV/HCV COINFECTED PATIENTS

Mr. Boot Kaewboon



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical  
Microbiology and Immunology  
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology  
Faculty of Allied Health Sciences  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2014  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดทีเซลล์ต่อเชื้อไวรัสเอชไอวีในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
โดย	นายบุตร แก้วบุญ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวนรรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

.....กรรมการ  
(ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิระกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาวิณ ห่อทองคำ)

บุตร แก้วบุญ : การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดที่เซลล์ต่อเชื้อไวรัสเอชไอวีในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HIV SPECIFIC T LYMPHOCYTE RESPONSES IN HIV/HCV COINFECTED PATIENTS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ปาลณี อัมรานนท์, 92 หน้า.

การติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีก่อให้เกิดปัญหาทางสาธารณสุข เนื่องจากการติดเชื้อร่วมกันทำให้พยาธิสภาพของโรครุนแรงขึ้น การดำเนินของโรคเอดส์เร็วขึ้น ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะมีความสำคัญมากในการต่อสู้และกำจัดเชื้อไวรัสในร่างกาย การติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบีทำให้ประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันต่ำลง การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวี ในอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีเปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธี Interferon gamma Enzyme Linked ImmunoSpot Assay และเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ด้วยวิธีโฟลไซโตเมตทรี ในตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์จำนวน 23 คน แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้ 1.) อาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 11 คน 2.) อาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีและรับประทานยา GPO vir จำนวน 8 คน และ 3.) อาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 4 คน ได้ผลการทดลองดังนี้ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่ำกว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี ในกลุ่มที่ 1 และ 2 เล็กน้อย กล่าวคือ จำนวนตัวอย่างที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide ของอาสาสมัครกลุ่มที่ 3 ผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเท่ากับ 25.00% ซึ่งต่ำกว่าอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยกลุ่มที่ 1 เท่ากับ 45.45% และกลุ่มที่ 2 เท่ากับ 87.50% ซึ่งกลุ่มที่ 3 น้อยกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ จำนวนตัวอย่างที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide ทั้ง 3 กลุ่มใกล้เคียงกัน คือ กลุ่มที่ 1 เท่ากับ 72.73% กลุ่มที่ 2 เท่ากับ 87.50% และกลุ่มที่ 3 เท่ากับ 75.00% ปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme A ในอาสาสมัครกลุ่มที่ 3 ผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (53.73%) มากกว่าอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่มที่ 1 (28.04%) และ กลุ่มที่ 2 (25.72%) โดยกลุ่มที่ 3 มากกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme B และ Perforin ในอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 มีมากกว่ากลุ่มที่ 2 เล็กน้อย และพบว่าปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme B และ Perforin มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณ CD4+T cell count โดยรวมแล้วภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีมีแนวโน้มลดลงในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของ Granzyme และ Perforin ที่พบมากในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบี การแสดงออกของ Granzyme และ Perforin ที่มากเกินไปบ่งบอกถึงความเสียหายของภูมิคุ้มกัน การศึกษาในครั้งนี้ทดลองในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก ข้อจำกัดในการควบคุมตัวแปรต่างๆ และยังมีผลการทดลองบางอย่างที่แสดงถึงความไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เปรียบเทียบ ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากกว่าเพื่อการสรุปผลที่ชัดเจนกว่านี้

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา ลายมือชื่อ.....

คลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา

ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2557



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความเมตตากรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาที่มีพระคุณยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่คอยแนะนำชี้แนวทาง ช่วยเหลือ และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ ประธานหลักสูตร และประธานกรรมการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นาวิณ ห่อทองคำ และ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล คณะกรรมการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ Dr. Alexandra Schuetz คุณโกศล ยงวานิชจิต คุณวีรวรรณ ชื่นอารมย์ คุณสุรัตน์ จงรักไทยแท้ คุณยุวดี พวงเงิน และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือทำงานวิจัย ตลอดจนขอแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณอาจารย์และบุคลากร คณะสหเวชศาสตร์ ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้มา ขอขอบคุณ คุณสยามภู สงวนสิทธิอินันต์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ หน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์สุขภาพ ที่ให้การช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ที่คอยอำนวยความสะดวกตลอดการทำกรวิจัย

ขอขอบพระคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน ที่ได้สละเวลาและกำลังกายเพื่องานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณ มารดา บิดา ขอขอบคุณ พี่ น้อง และเพื่อนๆ ทุกท่านที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือตลอดมา

คุณความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ขอมอบแต่อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
3. สมมติฐาน .....	4
4. ขอบเขตของงานวิจัย .....	5
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. โรคเอดส์ .....	6
1.1 ประวัติการค้นพบเชื้อเอชไอวี.....	6
1.2 โครงสร้างและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี.....	7
1.3 การติดต่อของเชื้อเอชไอวี .....	9
1.4 ลักษณะอาการของโรคเอดส์ .....	10
1.5 การตรวจวินิจฉัย.....	12
1.6 การป้องกันและการรักษา .....	18
2. โรคตับอักเสบซี.....	20
2.1 ประวัติการค้นพบไวรัสตับอักเสบซี.....	21

2.2 โครงสร้างและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	21
2.3 การติดต่อของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	23
2.4 ลักษณะอาการโรคตับอักเสบบี.....	24
2.5 การตรวจวินิจฉัย.....	25
2.6 การป้องกันและการรักษา.....	26
3. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน.....	28
3.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวี.....	28
3.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	33
3.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd.....	36
4. เทคนิคการตรวจวัดการตอบสนองของ T cell.....	41
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	44
1. อุปกรณ์และสารเคมี.....	44
2. เครื่องมือ.....	45
3. วิธีการทดลอง.....	46
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	55
1. การเก็บตัวอย่าง.....	55
2. Flow cytometry.....	56
3. ELISpot.....	63
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	66
รายการอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	92



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชุดตรวจที่องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้ตรวจหาอาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี.....	26
ตารางที่ 2 การจำแนกและรายละเอียดของกลุ่มตัวอย่าง.....	55
ตารางที่ 3 ค่ามัธยฐานสัดส่วนการแสดงออกของ cytolytic molecule ใน CD8+T cell.....	61
ตารางที่ 4 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า CD4+ T cell count กับ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin.....	62
ตารางที่ 5 จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool และ HIV-1 Env peptide pool .....	65
ตารางที่ 6 ค่ามัธยฐานจำนวน sfc ต่อล้านเซลล์ของ PBMCs ที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool และ HIV-1 Env peptide pool.....	65

## สารบัญภาพ

รูปที่ 1 จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเอดส์ในประเทศไทย .....	1
รูปที่ 2 การระบาดของเชื้อเอชไอวีและไวรัสตับอักเสบบี ในทหารเกณฑ์ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย.....	2
รูปที่ 3 โครงสร้างของเชื้อไวรัสเอชไอวี .....	8
รูปที่ 4 แผนผังยีนของ HIV-1 .....	9
รูปที่ 5 หลักการตรวจวินิจฉัยเอชไอวี 1 <sup>st</sup> – 2 <sup>nd</sup> generation EIA.....	13
รูปที่ 6 หลักการตรวจวินิจฉัยเอชไอวี 3 <sup>rd</sup> generation EIA.....	13
รูปที่ 7 หลักการตรวจวินิจฉัยเอชไอวี 4 <sup>th</sup> generation EIA.....	14
รูปที่ 8 แสดงหลักการ NAT.....	16
รูปที่ 9 แนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการ .....	17
รูปที่ 10 อนุภาคไวรัสตับอักเสบบี.....	22
รูปที่ 11 แสดงส่วนประกอบของสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี.....	23
รูปที่ 12 ปริมาณไวรัสเอชไอวีและปริมาณ CD4+T cell ในช่วงเวลาต่างๆ หลังการติดเชื้อเอชไอวี..	29
รูปที่ 13 บทบาทของ CD8+ T cell ต่อ CD4+T cell ในการยับยั้งเชื้อไวรัสและทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวี.....	30
รูปที่ 14 บทบาทของ Granzyme B และ Perforin.....	32
รูปที่ 15 การกระตุ้นการสร้าง IFN- $\beta$ โดยอาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี .....	34
รูปที่ 16 การเปรียบเทียบการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง.....	35
รูปที่ 17 กลไกการบุกรุกของเชื้อเอชไอวีและเชื้อไวรัสตับอักเสบบี .....	40
รูปที่ 18 ขั้นตอนการทำ ELISpot Assay ชั่ว.....	42
รูปที่ 19 ชุดทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและการอ่านผล .....	47
รูปที่ 20 แสดงการแยก PBMCs ด้วยสาร Histopaque-1077 โดยใช้ Accuspin tube.....	48
รูปที่ 21 จำนวนช่องของ Haemocytometer ช่องที่ใช้นับเซลล์ .....	49

รูปที่ 22 การแบ่งแกนเพื่อแบ่งประชากรของเซลล์ระหว่างกลุ่มที่มีผลบวกและลบ ..... 51

รูปที่ 23 แผนผังแสดงการใส่สารกระตุ้น และ PBMCs..... 52

รูปที่ 24 ลักษณะของเซลล์ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACs caliber..... 57

รูปที่ 25 ลักษณะของประชากรเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Granzyme A ..... 58

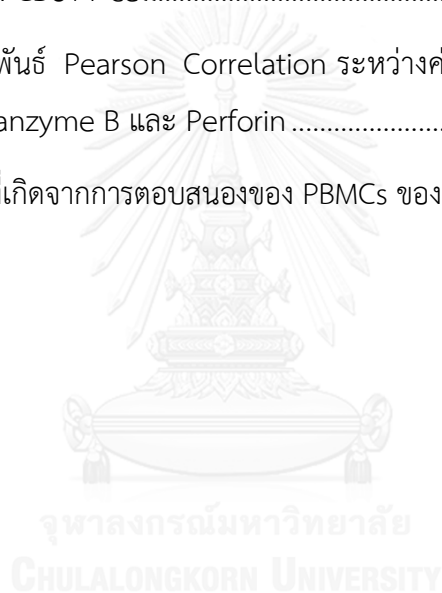
รูปที่ 26 ลักษณะของประชากรเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Granzyme B ..... 59

รูปที่ 27 ลักษณะของประชากรเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Perforin ..... 60

รูปที่ 28 กราฟเปรียบเทียบค่ามัธยฐานสัดส่วนการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B  
และ Perforin ของ CD8+T cell..... 61

รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ Pearson Correlation ระหว่างค่า CD4+ T cell count กับ  
Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ..... 62

รูปที่ 30 ลักษณะ spot ที่เกิดจากการตอบสนองของ PBMCs ของอาสาสมัคร..... 64

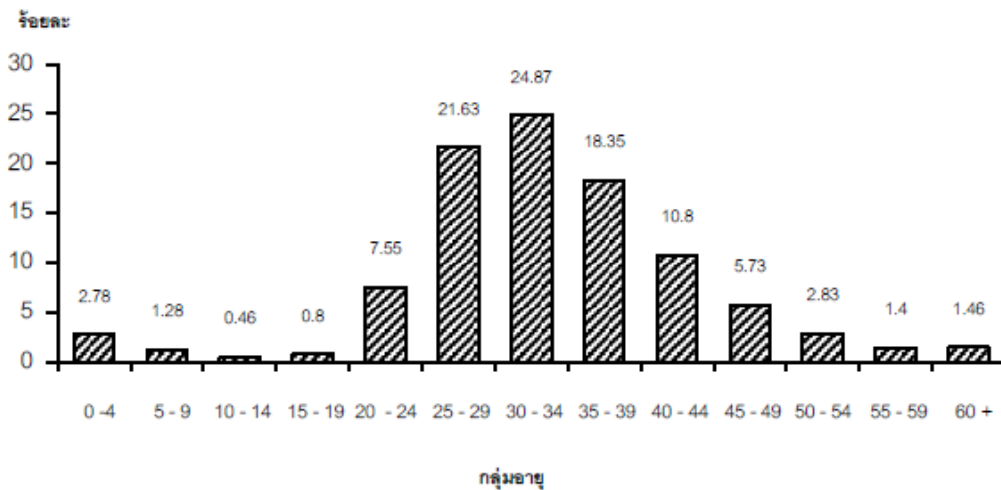


# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเอดส์เป็นโรคที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อเอชไอวี (Human Immunodeficiency Virus, HIV) รวมแล้วกว่า 388,621 คน และเสียชีวิตแล้ว 100,617 คน กลุ่มผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นกลุ่มคนวัยทำงานที่มีอายุระหว่าง 25-44 ปี คิดเป็น 75.65% ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด ดังรูปที่ 1 และผู้ป่วยอายุระหว่าง 20-24 ปี มีจำนวนมากถึง 7.55% ซึ่งกลุ่มนี้จะเป็นกลุ่มคนทำงานในอนาคต (1) ขณะที่สถานการณ์การระบาดทั่วโลกเมื่อ พ.ศ. 2556 พบว่ามีผู้ติดเชื้อจำนวนมากถึง 78 ล้านคน และเสียชีวิตแล้วประมาณ 39 ล้านคน (2)

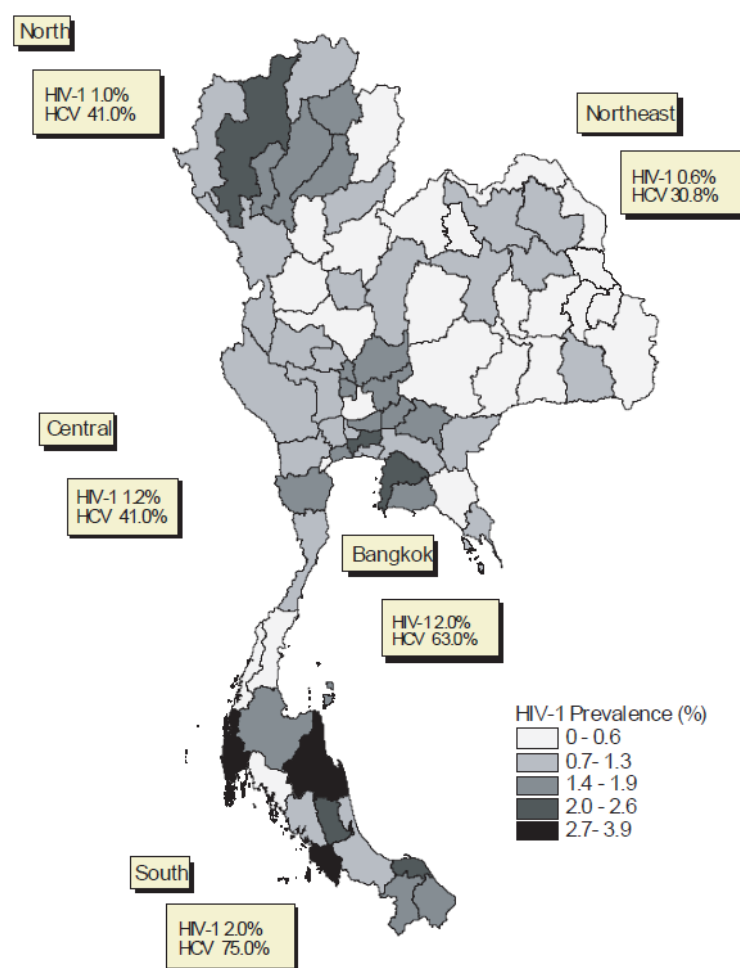


รูปที่ 1 จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเอดส์ในประเทศไทย พ.ศ. 2527-31 ตุลาคม พ.ศ. 2557 จำแนกตามอายุ (1)

ปัญหาของการรักษาผู้ป่วยเอดส์คือ มีการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น เชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus, HBV) เชื้อไวรัสตับอักเสบบีซี (Hepatitis C Virus, HCV) การติดเชื้อดังกล่าวในผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะทำให้การดำเนินโรครุนแรงขึ้น ทั่วโลกมีคนที่ติดเชื้อเอชไอวีประมาณ 35 ล้านคน ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 175 ล้านคน และ เชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 375 ล้านคน (2) ซึ่งจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีมากเป็นห้าเท่าของผู้ติดเชื้อเอชไอวี (3)

ทั้งเชื้อเอชไอวีและเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซี มีปัจจัยเสี่ยงทางการติดต่อเหมือนกัน ดังนั้นจึงพบผู้ติดเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกัน (HIV/HCV coinfection) ในคนเดียวกันได้ ผู้ติดเชื้อเอชไอวีในประเทศ

สหรัฐอเมริกาประมาณ 1.2 ล้านคน ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd มากถึง 25% (4) และผู้ติดเชื้อ เอชไอวีในยุโรปมีการติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd ประมาณ 30-50% (5) ในผู้ชายไทยผู้ติดเชื้อเอช ไอวี ที่เป็นทหารเกณฑ์อายุ 21 ปี พบว่าติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd มากถึง 49.5% (6) ขณะที่ รายงานของ Somnuek และคณะ พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีในโรงพยาบาลรามาริบดี กรุงเทพมหานคร จำนวน 529 คน ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd มากถึง 7.8% (7)



รูปที่ 2 การระบาดของเชื้อเอชไอวีและไวรัสตับอักเสบซี ในทหารเกณฑ์ในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ และกรุงเทพมหานคร มีผู้ติดเชื้อเอชไอวี 1.0%, 0.6%, 1.2%, 2.0% และ 2.0% ตามลำดับ และในผู้ติดเชื้อเอชไอวีดังกล่าวติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี 41.0%, 30.8%, 41.0%, 75.0% และ 63.0% ตามลำดับ (6)

เชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญต่อปัญหาสาธารณสุข เมื่อมีการติดเชื้อร่วมกัน การเกิดพยาธิสภาพของโรคจะรุนแรงมากขึ้น และเพิ่มอัตราการตายในผู้ป่วย การติดเชื้อ HIV/HCV

coinfected จะส่งผลกระทบต่อการรักษา โดยไปลดประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันที่ต้านทานเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (8) จากการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นหนึ่งในสาเหตุการตายในผู้ติดเชื้อเอชไอวี (9) ที่สำคัญไวรัสทั้งสองชนิดนี้มีช่องทางการติดต่อที่เหมือนกัน คือ การติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การติดต่อทางเลือด และการติดต่อจากแม่สู่ลูก (10, 11) การติดเชื้อ HIV/HCV coinfected จะเร่งการดำเนินโรคของโรคตับให้เร็วขึ้น พบว่าการติดเชื้อร่วมกันนี้มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับผู้ที่ติดเชื้อชนิดเดียวไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อเอชไอวีอย่างเดียว หรือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างเดียว (12) โดยปกติผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่วนใหญ่ (85-90%) จะแสดงอาการของโรคเอดส์ ประมาณ 10 ปี หลังได้รับเชื้อ บางส่วนแสดงอาการหลังจากได้รับเชื้อประมาณ 2-3 ปี (2-10%) และผู้ป่วยอีกบางส่วน (2-5%) ไม่แสดงอาการเลยแม้ว่าจะรับเชื้อมานานถึง 10-30 ปี (13) หรือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีผู้ป่วยส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการในระยะเฉียบพลัน ผู้ป่วยประมาณ 20-25% จะแสดงอาการรุนแรงต่อตับภายในเวลานาน 20 ปี (14) การดำเนินโรคเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความสามารถของภูมิคุ้มกันในแต่ละบุคคล ภูมิคุ้มกันในร่างกายมีบทบาทในการกำจัดเชื้อไวรัส ในผู้ป่วยเอชไอวี CD8+ T cells มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อไวรัส ขณะที่ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี CD4+ T cells มีบทบาทมากกว่า (15) ในผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfected พบว่ามีการดำเนินโรคที่เร็วขึ้นเนื่องจากการสูญเสียภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบี (12) ขณะที่การสูญเสียภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีในผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfected ยังไม่พบรายงาน ในการศึกษาจึงต้องการเปรียบเทียบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีในผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfected เทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีอย่างเดียว

การติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HIV/HBV coinfection) เชื้อเอชไอวีเพิ่มความเสี่ยงของการเป็นโรคตับแข็งและการดำเนินโรคสู่ระยะสุดท้ายในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (16) และเพิ่มอัตราการอักเสบของตับและมีผลกระทบต่อการรักษาด้วยยา (17) เชื้อเอชไอวีทำให้เกิดการสูญเสียภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบี (18) และพบว่าผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีความเสี่ยงในการป่วยด้วยโรคตับเพิ่มขึ้น 2-3 เท่า ในกลุ่ม HIV/HBV coinfected เมื่อเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีอย่างเดียว (9, 19) ผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่ออาการแสดงของโรคเอดส์พบว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเพิ่มอัตราการดำเนินของโรคเอดส์ (20) ขณะที่บางรายงานพบว่าเชื้อตับอักเสบบีไม่มีผลต่อการดำเนินของโรคเอดส์ แต่ส่งผลกระทบต่อภูมิคุ้มกันและการรักษาโดยมีผลต่อการตอบสนองต่อยาต้านเอชไอวี (21) การศึกษาผลกระทบของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีรายงานแล้วจำนวนมาก แต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวี ทางผู้วิจัยจึงได้สนใจปัญหาและผลกระทบจากการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสตับอักเสบบีและเอชไอวี เพื่อให้ทราบถึงผลกระทบจากการติดเชื้อ HIV/HCV coinfected ต่อภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีชนิด T cell ว่ามีความแตกต่างกันอย่างไรเมื่อเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีอย่างเดียว

ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี การตรวจพบ CD8+ T cells ในปริมาณสูง และปริมาณไวรัสในกระแสเลือดต่ำ พบในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีเป็นเวลานานแต่ไม่แสดงอาการ (Long-Term Non Progressor) (22) แสดงให้เห็นว่า CD8+ T cells มีบทบาทในการควบคุมปริมาณไวรัส การป้องกันและทำลายเซลล์ติดเชื้อของ CD8+ T cells ประกอบด้วยกลไก 2 แบบ ได้แก่ การทำให้เซลล์ติดเชื้อแตก และไม่ทำให้เซลล์ติดเชื้อแตก (23) การทำให้เซลล์ติดเชื้อแตกทำได้โดยการหลั่ง Cytolytic molecule ได้แก่ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin (24) หรือ การ Apoptosis โดยการเหนี่ยวนำของ Fas ligand กลไกการป้องกันโดยไม่ทำให้เซลล์แตก คือ การสร้างสารไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ติดเชื้อ สารที่สร้างได้แก่ Interferon gamma และ Interferon alpha (25)

Interferon gamma (IFN gamma) เป็นสาร Chemokine ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Type II Interferon มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ช่วยส่งเสริมการต่อต้านไวรัสโดยเหนี่ยวนำการสร้าง Proteasome เพิ่มการแสดงออกและเพิ่มความเสถียรของ Major Histocompatibility Complex (MHC) class I ดังนั้น IFN gamma จึงเป็นโมเลกุลแรกๆ ที่ถูกใช้ในการศึกษาบทบาทหน้าที่และการตอบสนองของ CD8+T cell ต่อการติดเชื้อหรือศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันต่อวัคซีน โดยใช้เทคนิค Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) assay (26)

## 2. วัตถุประสงค์การวิจัย

- 2.1 เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของ CD8+T cell ต่อ HIV-1 Gag และ HIV-1 Env peptide ในกลุ่มตัวอย่าง HIV/HCV coinfectd เทียบกับกลุ่มตัวอย่าง HIV monoinfected ด้วยวิธี Interferon Gamma ELISpot Assay
- 2.2 เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่สร้างสาร Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ในกลุ่มตัวอย่าง HIV/HCV coinfectd เทียบกับกลุ่มตัวอย่าง HIV monoinfected

## 3. สมมติฐาน

- 3.1 กลุ่มตัวอย่าง HIV monoinfected มี HIV specific T cell มากกว่ากลุ่มตัวอย่าง HIV/HCV coinfectd
- 3.2 กลุ่มตัวอย่าง HIV monoinfected มีเซลล์ที่สร้างสาร Granzyme A, Granzyme B และ Perforin มากกว่ากลุ่มตัวอย่าง HIV/HCV coinfectd

#### 4. ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบ Cross-sectional study โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครที่ติดเชื้อเอชไอวี จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย แยกพลาสมาจากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร นำพลาสมามาทดสอบหาแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบบี เพื่อแยกกลุ่ม HIV monoinfected และ HIV/HCV coinfectd แยกเซลล์เม็ดเลือดชนิด Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) เพื่อใช้ทดสอบหาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะชนิด T cell ต่อเชื้อเอชไอวีโดยใช้ HIV-1 Gag peptide pool และ HIV-1 Env Peptide pool เป็นสารทดสอบโดยวิธี Interferon Gamma ELISpot Assay และทดสอบหาปริมาณการสร้างสาร Granzyme และ Perforin ด้วยวิธี Flow Cytometry และใช้ค่าทางสถิติคำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง

#### 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้ติดเชื้อเอชไอวี การติดเชื้อร่วมกันอาจส่งผลให้ภูมิคุ้มกันชนิด T lymphocyte ที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีลดลง เช่น ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อ HIV-1 Gag และ HIV-1 Env การศึกษานี้ตรวจวัดปริมาณ T lymphocyte ที่สร้างสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมา ซึ่งบ่งบอกถึงการมีภูมิคุ้มกันต่อเอชไอวีในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง นอกจากนี้ยังศึกษาปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สร้างจาก Cytotoxic T Lymphocytes และมีความสำคัญต่อการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ การติดเชื้อร่วมกันอาจทำให้ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอชไอวีลดลง ส่งผลให้ความสามารถในการต่อต้านเชื้อเอชไอวีลดลง ทำให้การดำเนินโรครุนแรงขึ้น ผลจากการศึกษานี้จะได้นำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้พัฒนาการรักษาให้ได้ผลมากขึ้น



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. โรคเอดส์

โรคเอดส์ หรือ Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) คือ โรคภูมิคุ้มกันบกพร่องที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (Human Immunodeficiency Virus, HIV) และเข้าไปทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ภูมิคุ้มกันอ่อนแอและเสียสมดุล จนร่างกายอ่อนแอลงทำให้ไม่สามารถต่อสู้กับเชื้อโรคหรือเชื้อฉวยโอกาสได้ เชื้อฉวยโอกาสเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ไม่ก่อโรคในคนปกติ และในคนที่มีภูมิคุ้มกันปกติร่างกายสามารถต่อสู้กับเชื้อฉวยโอกาสดังกล่าวได้ แต่ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ระบบภูมิคุ้มกันถูกทำลายลงจนอ่อนแอร่างกายจะไม่สามารถต่อสู้กับเชื้อเหล่านั้นได้ (27)

##### 1.1 ประวัติการค้นพบเชื้อเอชไอวี

ต้นกำเนิดของเอชไอวีสันนิษฐานว่ามาจากเชื้อไวรัสของลิงชนิดต่างๆ ถูกส่งผ่านมาสู่คนในทวีปแอฟริกา และเชื้อ HIV-1 น่าจะพัฒนามาจากเชื้อเอสไอวี (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) ของลิงชิมแปนซี (Chimpanzee) ที่อาศัยในประเทศแคเมอรูน ขณะที่ HIV-2 น่าจะพัฒนามาจากเชื้อ SIVsm ของลิง Sooty mangabey ที่อาศัยในป่าแอฟริกาตะวันตก (13)

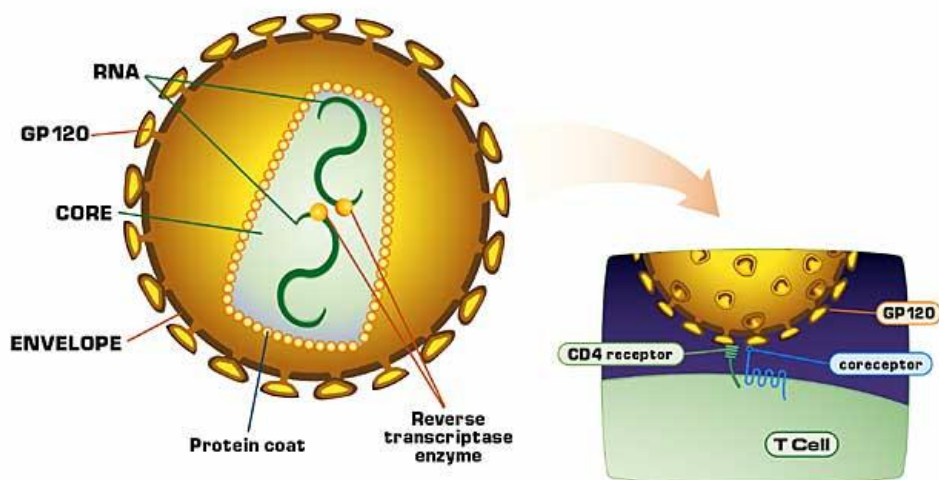
มีรายงานการพบผู้ป่วยที่มีอาการของโรคนี้อันครั้งแรกในอเมริกาเมื่อเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2524 ผู้ป่วยเป็นชายรักร่วมเพศ มีสุขภาพแข็งแรงและไม่เคยใช้ยาคุมกำเนิดมาก่อน ต่อมาได้ป่วยเป็นโรคปอดบวมจากการติดเชื้อ *Pneumocystis carinii* (ปัจจุบันชื่อ *P. jiroveci*) (13) และพบว่าสาเหตุของโรคเกิดจากการติดเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายและเพิ่มจำนวนในเม็ดเลือดขาว ทำลายเม็ดเลือดขาวจนระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถทำหน้าที่ต่อสู้ทำลายเชื้อโรคและเซลล์มะเร็งได้ (27) ในปี พ.ศ. 2526 Dr. Luc Montagnier และ Dr. Barré-Sinoussi จากสถาบันปาสเตอร์ กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส สามารถเพาะเลี้ยงแยกเชื้อจากต่อมน้ำเหลืองของชายรักร่วมเพศได้เป็นครั้งแรก โดยชายดังกล่าวมีอาการต่อมน้ำเหลืองโต จึงตั้งชื่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ว่า Lymphadenopathy Associated Virus (LAV) ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น Immune Deficiency Associated Virus (IDAV) ในปีต่อมา Dr. Robert Gallo แยกเชื้อไวรัสจากเม็ดเลือดขาวของคนไข้ที่มีอาการสัมพันธ์กับโรคเอดส์ได้ และเรียกชื่อไวรัสนี้ว่า Human T-cell Lymphotropic Virus type III (HTLV III) ในปีเดียวกัน Jay Levy ได้แยกเชื้อจากผู้ป่วยโรคเอดส์ได้ และเรียกชื่อว่า AIDS Related Virus (ARV) พ.ศ. 2529 คณะกรรมการศึกษา Retrovirus ได้เปรียบเทียบไวรัสทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าวแล้วพบว่า เป็นเชื้อชนิดเดียวกัน จึงได้ตั้งชื่อว่า Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) ในปีเดียวกัน Clavel ได้พบเชื้อ HIV-2 ที่มีลักษณะต่างจาก HIV-1 ประมาณ 50-60% (27-29)

มีรายงานว่าพบผู้ป่วยเอดส์รายแรกของประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2527-2528 ผู้ป่วยรายแรกเป็นชายชาวอเมริกาใต้เข้ารับการรักษาตัวที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2527 และรายงานนี้ได้ถูกตีพิมพ์เมื่อ พ.ศ. 2528 (30) ช่วงปี พ.ศ. 2533-2542 พบการระบาดอย่างแพร่หลายในแถบประเทศอินเดีย พม่า กัมพูชา และไทย (13) จำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 ถึงวันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2557 รวมแล้วประมาณ 388,621 ราย และเสียชีวิตแล้วประมาณ 100,617 คน (1) และองค์การอนามัยโลกรายงานจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีว่า จำนวนผู้ติดเชื้อทั่วโลกตั้งแต่เริ่มมีการระบาดจนถึงสิ้นปี พ.ศ. 2555 มีประมาณ 78 ล้านคน และเสียชีวิตแล้วประมาณ 39 ล้านคน จำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ยังมีชีวิตอยู่มีประมาณ 35 (33.2-37.2) ล้านคน (2)

การระบาดของเชื้อเอชไอวีพบว่า สายพันธุ์ HIV-1 พบการระบาดได้ทั่วโลก ขณะที่สายพันธุ์ HIV-2 ตรวจพบในประเทศแถบทวีปแอฟริกาตะวันตก ได้แก่ ประเทศกินี-บิสเซา แกมเบีย เซเนกัล กาบองเวสต์ โกตดิวัวร์ มาลี เซียร์ราลีโอน และไนจีเรีย นอกจากนี้ยังพบการกระจายของเชื้อไปยังประเทศอื่นๆ ในทวีปแอฟริกา ทวีปยุโรป ประเทศอินเดีย และประเทศสหรัฐอเมริกา (31) ในประเทศไทยสายพันธุ์ที่ระบาดหลักคือ HIV-1 และเคยมีรายงานตรวจพบ HIV-2 ในชาวต่างชาติจำนวน 2 คน แต่ไม่มีรายงานว่าพบในคนไทย การศึกษาของ Chanbancherd และคณะ ซึ่งศึกษาในเลือดจำนวน 1013 ตัวอย่าง ที่ให้ผลลบจากการตรวจคัดกรองด้วยชุดตรวจ HIV-1 และ HIV-2 พบว่าเลือดที่มีผลบวกต่อชุดตรวจ HIV-1 อย่างเดียว มีจำนวน 273 คน ให้ผลบวกทั้ง HIV-1 และ HIV-2 มีจำนวน 740 คน ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ HIV-1 ทั้งหมด การศึกษานี้ไม่พบเลือดที่ให้ผลบวกกับ HIV-2 (32)

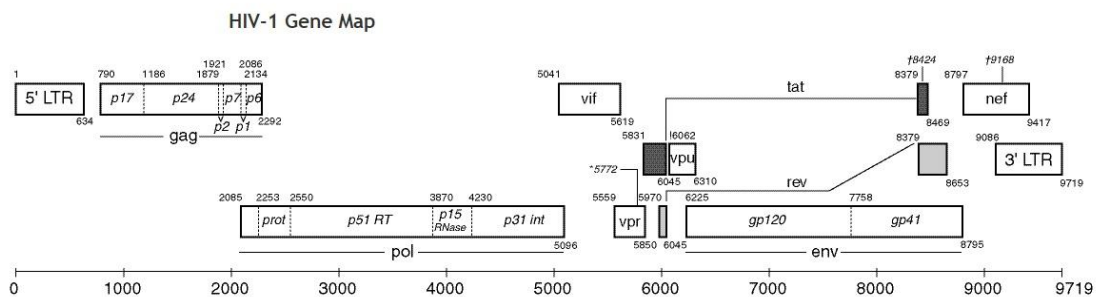
## 1.2 โครงสร้างและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี

เชื้อเอชไอวีเป็นไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอไวรัสจัดอยู่ใน Family *Retroviridae* อยู่ใน Subfamily *Lentivirinae* และอยู่ใน Genus *Lentivirus* แบ่งออกเป็น 2 types ได้แก่ HIV-1 และ HIV-2 (33) HIV-1 แบ่งได้ 4 กลุ่มคือ M, N, O และ P (34) กลุ่ม M มีหลาย Subtypes ได้แก่ A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF และ URF HIV-2 แบ่งได้ 2 กลุ่มคือ A และ B (35) โครงสร้างไวรัสประกอบด้วยสารพันธุกรรมเป็นชนิด RNA สายบวก (Positive-sense Ribonucleic Acid) จำนวนสองเส้น แต่ละเส้นประกอบด้วยยีนจำนวน 9 ยีน RNA ทั้งสองเส้นนี้ถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนที่เรียกว่า Capsid ซึ่งประกอบด้วย p24 Viral Protein ถัดจาก Capsid จะมีเปลือกห่อหุ้มที่เรียกว่า Envelope ซึ่งมีส่วนประกอบเป็น Lipid bilayer และ Glycoprotein ชนิด gp120 ดังรูปที่ 3 (29, 33)



รูปที่ 3 โครงสร้างของเชื้อไวรัสเอชไอวี ซึ่งประกอบด้วย RNA, Reverse Transcriptase Enzyme, Protein Coat, Envelope และ gp120 (36)

จีโนมของเอชไอวีประกอบด้วยยีนจำนวน 9 ยีน ได้แก่ 1.) ยีน *Gag* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีนในกลุ่ม Capsid Protein ได้แก่ โปรตีน p17, p24, p7 และ p6 (37) 2.) ยีน *Pol* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์เอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ Protease, Reverse transcriptase และ Integrase (33, 38) 3.) ยีน *Env* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์ gp160 ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้นสำหรับสร้าง external glycoprotein gp120 และ transmembrane glycoprotein gp41 โดยทั้งสองโปรตีนนี้เป็นส่วนประกอบของเปลือกหุ้มไวรัส หรือ Envelope โปรตีน gp120-gp41 ทำหน้าที่จับกับผิวของ CD4+T cell 4.) ยีน *Tat* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีน Tat 5.) ยีน *Rev* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีน Rev 6.) ยีน *Vif* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีน Vif 7.) ยีน *Vpr* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์ Viral protein R (Vpr) 8.) ยีน *Vpu* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์ Viral protein U (Vpu) ยีนนี้พบในไวรัส HIV-1, SIVcpz, SIV-GSN, SIV-MUS, SIV-MON และ SIV-DEN แต่ไม่พบในไวรัส HIV-2 และ SIV-SMM ในไวรัส HIV-2 พบยีน VPX เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีน Viral protein X (Vpx) นอกจากพบในไวรัส HIV-2 ยังพบใน SIV-SMM, SIV-RCM, SIV-MND-2 และ SIV-DRL แต่ไม่พบยีนนี้ใน HIV-1 9.) ยีน *Nef* เป็นยีนที่มีรหัสสำหรับสังเคราะห์โปรตีน Nef ดังรูปที่ 4 (33, 39)



รูปที่ 4 แผนผังยีนของ HIV-1 ประกอบด้วยยีนจำนวน 9 ยีน ได้แก่ *Gag*, *Pol*, *Env*, *Vpr*, *Vpu*, *Vif*, *Tat*, *Rev* และ *Nef* (40)

### 1.3 การติดต่อของเชื้อเอชไอวี

การติดเชื่อเอชไอวีส่วนใหญ่ติดต่อกันทางเพศสัมพันธ์ การติดต่อกับเชื้อครั้งแรกเกิดขึ้นโดยเยื่อบุผิวตามช่องคลอดหรือทวารหนักสัมผัสกับเชื้อเอชไอวี และไวรัสได้ผ่านเยื่อเมือกเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) ของบริเวณดังกล่าว หรือเชื้อไวรัสสัมผัสโดยตรงกับ Dendritic cell, CD4+ T cell และ Macrophages การติดต่อจากคนสู่คนขึ้นกับอีกหลายปัจจัย ได้แก่ ลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อ ปริมาณเชื้อ ความไวต่อการติดเชื่อของเซลล์ ลักษณะภูมิคุ้มกันของบุคคลนั้น การติดเชื่อเอชไอวีนั้นมักเกิดจากการติดเชื่อเพียงอนุภาคเดียว เรียกไวรัสตั้งต้น นั้นว่า *Founder virus* ส่วนไวรัสที่พบระยะท้ายๆ ของการติดเชื่อเรียกว่า Quasi-species ซึ่งมีจีโนมที่ใกล้เคียงกันแต่ไม่เหมือนกันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ขณะเพิ่มจำนวน (13) ไวรัสเอชไอวีมี Host cell คือ CD4+ T cell และ Macrophages ซึ่งวงจรชีวิตของเชื้อเอชไอวีเริ่มขึ้นเมื่อไวรัสเข้าสู่ Host cell โดยอาศัยโมเลกุล Envelope Glycoprotein gp120 ซึ่งปรากฏที่ผิวของ HIV Envelope จับกับ CD4+ Receptor และ Chemokine Receptor ที่อยู่ที่ผิวเซลล์ของ CD4+ T cell ดังรูปที่ 3 Chemokine Receptor เป็น Co-Receptors ของ HIV-1 ได้แก่ CCR5 และ CXCR4 (41) การทดลองให้เชื้อเอชไอวีแก่ลิงทางช่องคลอดพบว่าปากมดลูกเป็นบริเวณแรกที่ติดเชื่อ (42) และเซลล์กลุ่มแรกที่ติดเชื่อคือเซลล์ที่มี Receptor บนผิวเซลล์ชนิด CD4 และ CCR5 ซึ่งอาศัยอยู่ในบริเวณของ Memory T cell (43) หลังจากนั้น สองวันเชื้อจะเข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองผ่านทาง Dendritic cell และ CD4+ T cell และเข้าสู่กระแสเลือดในที่สุด (13) เชื้อเอชไอวีจะเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ แล้วออกจากเซลล์เพื่อเข้าสู่เซลล์ใหม่เริ่มวงจรชีวิตอีกครั้ง การออกจากเซลล์นั้นมีผลให้ Host cell ถูกทำลาย ส่งผลให้ CD4+ T cell ลดจำนวนลง เมื่อ CD4+ T cell ถูกทำลายจำนวนมาก ส่งผลให้ร่างกายอ่อนแอ มีโอกาสติดเชื่อฉวยโอกาส และแสดงอาการของโรคเอดส์ในที่สุด (33) การลดลงของ CD4+ T lymphocyte เกิดจากสาเหตุดังต่อไปนี้ 1.) Cytopathic effect เป็นผลโดยตรงจากกลไกการบุกรุกของเชื้อไวรัส (44) 2.) Apoptosis ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนจากเชื้อเอชไอวี ได้แก่ Env, Nef, Vpu, Vpr (45, 46) 3.) การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มากเกินไปทำให้เกิด CD4+ T cell Depletion (47) และ 4.) การเหนี่ยวนำการ Apoptosis ของเซลล์ที่ไม่ติดเชื่อ (Uninfected Bystander T lymphocytes) โดย Envelop Glycoprotein (48)

การติดต่อของเชื้อเอชไอวีจากคนสู่คนสามารถติดต่อได้หลายช่องทาง เช่น ทางเลือด ทางแม่สู่ลูก ทางสารคัดหลั่งอสุจิและสารคัดหลั่งของช่องคลอด (Semen and Vaginal Secretions) (49) ปริมาณเชื้อในสารคัดหลั่งจากอวัยวะเพศนั้นสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อในกระแสเลือด การติดเชื้อในระยะเฉียบพลันและระยะสุดท้ายของโรคมักพบปริมาณเชื้อในกระแสโลหิตปริมาณมาก และพบเชื้อปริมาณมากในสารคัดหลั่งเช่นกัน ส่งผลให้อัตราการแพร่เชื้อในระยะนี้สูงกว่าระยะอื่น 20 เท่า (13) พฤติกรรมและสภาวะที่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ คือ ไม่สวมถุงยางอนามัยในการร่วมเพศทั้งทางช่องคลอดและทวารหนัก และเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์อื่นๆ ด้วย เช่น Syphilis, Herpes, Chlamydia, Gonorrhea และ Bacterial Vaginosis (การติดเชื้อแบคทีเรียทางช่องคลอด) เชื้อเอชไอวีไม่สามารถติดต่อโดยการจูบ การกอด การจับมือ หรือการรับประทานอาหารและน้ำร่วมกัน นอกจากนี้แล้วการใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน หรือใช้อุปกรณ์ฉีดยาเสพติดร่วมกัน การได้รับการถ่ายเลือดที่มีการติดเชื้อ การใช้อุปกรณ์การแพทย์ที่ไม่ปราศจากเชื้อ หรือได้รับอุบัติเหตุเข็มฉีดยาที่มแทงล้วนเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อทั้งนั้น (49)

#### 1.4 ลักษณะอาการของโรคเอดส์

ผู้ติดเชื้อเอชไอวีแบ่งเป็นหลายกลุ่มตามความสัมพันธ์ของระยะเวลาหลังการติดเชื้อและการเข้าสู่ระยะแสดงอาการของโรค ผู้ติดเชื้อราว 85-90% จะเข้าสู่ระยะแสดงอาการของโรคประมาณ 10 ปี เรียกกลุ่มนี้ว่า Typical Progressor กลุ่มนี้มี CD4+T cell ลดลงต่ำกว่า 350 เซลล์ต่อไมโครลิตร และสูญเสียหน้าที่ของภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะการตอบสนองที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีของ CD4+T cell และ CD8+T cell มีการทำลายต่อมน้ำเหลืองโดยไวรัส ระยะนี้จะพบเชื้อเอชไอวีชนิด X4 (ชนิดที่ใช้ Co-Receptor ชนิด CXCR4) หรือเชื้อเอชไอวีชนิด R5 (ชนิดที่ใช้ co-receptor ชนิด CCR5) ที่มีความรุนแรงสูง (13)

ผู้ติดเชื้อประมาณ 2-10% จะเข้าสู่ระยะแสดงอาการของโรคประมาณ 2-3 ปี เรียกกลุ่มนี้ว่า Rapid Progressor ขั้นตอนการดำเนินโรคจะคล้าย Typical Progressor แต่จะมีการดำเนินโรคที่รวดเร็วกว่ามาก (13)

ผู้ติดเชื้อประมาณ 2-5% สามารถดำเนินชีวิตได้ตามปกติโดยไม่แสดงอาการใดๆ ของโรค แม้จะติดเชื้อนานกว่า 10-30 ปี ผู้ติดเชื้อจะมีปริมาณ CD4+T cell ปกติ และไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสเลย จึงเรียกกลุ่มนี้ว่า ผู้ติดเชื้อเป็นเวลานานแต่ไม่แสดงอาการ (Long-term Survivor หรือ Long-term non-Progressor, LTNPs) (13)

ปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิดพยาธิสภาพของการติดเชื้อเอชไอวี คือ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มติดเชื้อระยะเฉียบพลัน การกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องเป็นตัวบ่ง

บอกถึงการติดเชื้อเอชไอวีแบบเรื้อรัง การศึกษาในลิง Sooty Mangabey ซึ่งเป็นโมเดลการติดเชื้อเอชไอวีแบบไม่ก่อโรค จากการศึกษาแม้ว่าจะมีปริมาณไวรัสในเลือดสูงและจำนวน CD4+T cell ลดลง แต่ไม่เคยปรากฏหลักฐานการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่อง แสดงว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างต่อเนื่องเป็นปัจจัยสำคัญของการพัฒนาไปสู่ระยะโรคเอดส์ (13)

อาการแสดงออกของโรคเอดส์ แบ่งออกเป็น 3 ระยะดังนี้

### ระยะที่ 1 ระยะไม่แสดงอาการของโรค

เป็นระยะหลังการติดเชื้อภายใน 2-3 สัปดาห์แรก ยังไม่มีอาการอะไรปรากฏให้เห็นชัดเจน ประมาณ 10% ของผู้ติดเชื้อจะมีอาการมีไข้ เจ็บคอ ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว ต่อม้ำเหลืองโต ผื่นตามตัว เป็นอยู่ประมาณ 10-14 วันจะหายไปเอง ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่จึงเข้าใจว่าเป็นไข้หวัดธรรมดา (49)

### ระยะที่ 2 เริ่มแสดงอาการสัมพันธ์กับโรคเอดส์

ระยะนี้เป็นระยะที่เริ่มมีอาการสัมพันธ์กับเอดส์ คนไข้เริ่มมีอาการแต่ยังไม่มาก อาการที่ปรากฏในช่วงนี้ได้แก่ เป็นไข้เรื้อรัง น้ำหนักลด ท้องเสียเรื้อรังโดยไม่ทราบสาเหตุ นอกจากนี้อาจมีเชื้อราในช่องปาก งูสวัด เริ่มในช่องปากหรืออวัยวะเพศ มีผื่นคันตามแขนขาและลำตัวคล้ายคนแพ้ น้ำลายเยิ้ม อาการที่แสดงออกนี้เป็นอาการที่ไม่จำเพาะสำหรับโรคเอดส์เสมอไป คนที่เป็นโรคอื่นๆ ก็อาจมีไข้ น้ำหนักลด ท้องเสีย เชื้อราในช่องปาก งูสวัด หรือเริ่มได้ (49, 50)

### ระยะที่ 3 ระยะแสดงอาการของโรคเอดส์

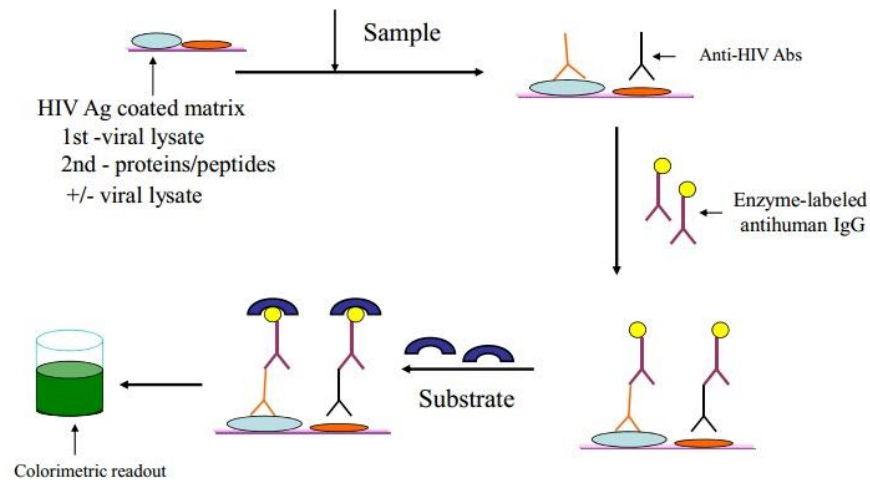
ระยะแสดงอาการของโรคเอดส์หรือระยะโรคเอดส์เต็มขั้น ระยะสุดท้ายของการติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งผู้ป่วยมีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดสูง ภูมิคุ้มกันของร่างกายเสียไปมาก และค่า CD4+T cell count ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อไมโครลิตร ส่งผลให้ร่างกายไวต่อการติดเชื้อโรคฉวยโอกาส เช่น *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, Cytomegalovirus (CMV), Toxoplasmosis และ Candidiasis (41) และอาจเป็นมะเร็งบางชนิด เช่น แคปไซ์ซาร์โคมา (Kaposi's sarcoma) มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีอาการ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ มีอาการไข้ ปวดศีรษะ ซึมและอาเจียน นอกจากนี้คนไข้โรคเอดส์เต็มขั้นอาจมีอาการทางจิตประสาทได้ด้วย อาจมีอาการหลงลืมก่อนวัยอันควรเนื่องจากสมองฝ่อเหี่ยว หรือมีอาการของโรคจิต หรืออาการชักกระตุก ไม้รู้สีกตัว แขนขาชาหรือไม่มีแรง บางรายอาจมีอาการปวดร้าวคล้ายไฟช็อตหรือปวดเส็บปวดรื้อน หรืออาจเป็นอัมพาตครึ่งท่อน ปัสสาวะ อุจจาระไม่ออก หรือปวดท้อง ท้องเสีย และถ่ายเป็นเลือด เป็นต้น แคปไซ์ซาร์โคมา อาจเกิดในช่องปากในเยื่อบุทางเดินอาหาร ซึ่ง

อาจทำให้มีเลือดออกมาก ๆ ได้ ผู้ป่วยอาจเป็นมะเร็งต่อมน้ำเหลือง หรือมะเร็งปากมดลูก ดังนั้นผู้หญิงที่ติดเชื้อเอชไอวีจึงควรพบแพทย์เพื่อตรวจมะเร็งปากมดลูกทุก 6 เดือน ในแต่ละปี 5-6% ของผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมดจะเข้าสู่ระยะเอดส์เต็มขั้น คนที่เป็นโรคเอดส์เต็มขั้นแล้วจะเสียชีวิตภายใน 2-4 ปี จากโรคติดเชื้อฉวยโอกาส หรือเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็ง (50)

### 1.5 การตรวจวินิจฉัย

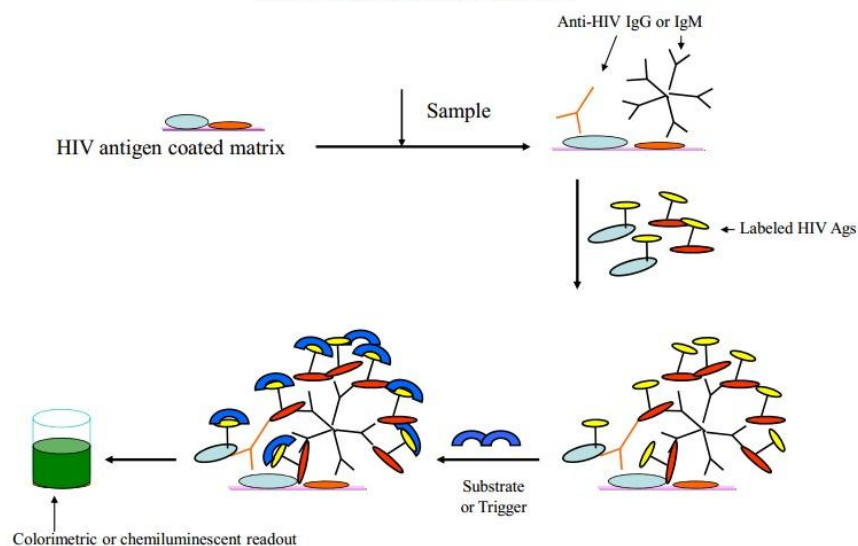
การตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อเอชไอวีด้วยวิธี Enzyme Immunoassay (EIA) ซึ่งวิธีนี้อาศัยหลักการการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี และตรวจวัดสัญญาณด้วยสีจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ สารเรืองแสง หรือ Chemiluminescent ในชุดตรวจรุ่นแรกๆ 1<sup>st</sup> generation ใช้หลักการ indirect EIA คือ แอนติเจนของเอชไอวีซึ่งได้จากการย่อยอนุภาคไวรัสถูกตรึงไว้ที่ solid phase เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชไอวีและติดฉลาก antihuman IgG เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนแล้ว 2<sup>nd</sup> generation มีหลักการเหมือนกับ 1<sup>st</sup> generation แต่แตกต่างที่แอนติเจนที่ใช้ตรึงบน Solid phase ใน 2<sup>nd</sup> generation นี้ใช้แอนติเจนที่เป็น recombinant หรือ synthetic peptide ทำให้มีความไวและความจำเพาะมากกว่า 1<sup>st</sup> generation ดังรูปที่ 5 จากนั้นได้มีการพัฒนาชุดตรวจเพิ่มอีกคือ 3<sup>rd</sup> generation ซึ่งใช้หลักการแอนติเจนแซนวิช คือ ตรึงแอนติเจนของเอชไอวีไว้ที่ solid phase และจับกับแอนติบอดีต่อเอชไอวี จากนั้นตรวจวัดด้วยแอนติเจนที่ติดฉลากแล้ววิธีนี้สามารถตรวจเจอทั้ง IgG และ IgM ดังรูปที่ 6 ซึ่ง IgM เป็นแอนติบอดีตัวแรกๆ ที่สร้างออกมา ทำให้สามารถตรวจเจอเชื้อได้เร็วกว่าสองรุ่นก่อนหน้านี้ 4<sup>th</sup> generation เป็นการพัฒนาเพิ่มมาจาก 3<sup>rd</sup> generation โดยเพิ่มการตรึงแอนติบอดีต่อโปรตีน HIV p24 ใน solid phase ทำให้สามารถตรวจหาทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีต่อเอชไอวี ดังรูปที่ 7 (35)

## 1st and 2nd Generation IA



รูปที่ 5 หลักการตรวจวินิจฉัยเอชไอวี 1<sup>st</sup> - 2<sup>nd</sup> generation EIA ในชุดตรวจ 1<sup>st</sup> generation จะใช้แอนติเจนที่ได้จากการย่อยอนุภาคไวรัสตรงไว้ที่ solid phase -ขณะที่ 2<sup>nd</sup> generation ใช้ recombinant หรือ synthetic peptide แทน และติดฉลากแอนติบอดีที่ antihuman IgG ตรวจจับแอนติบอดี (35)

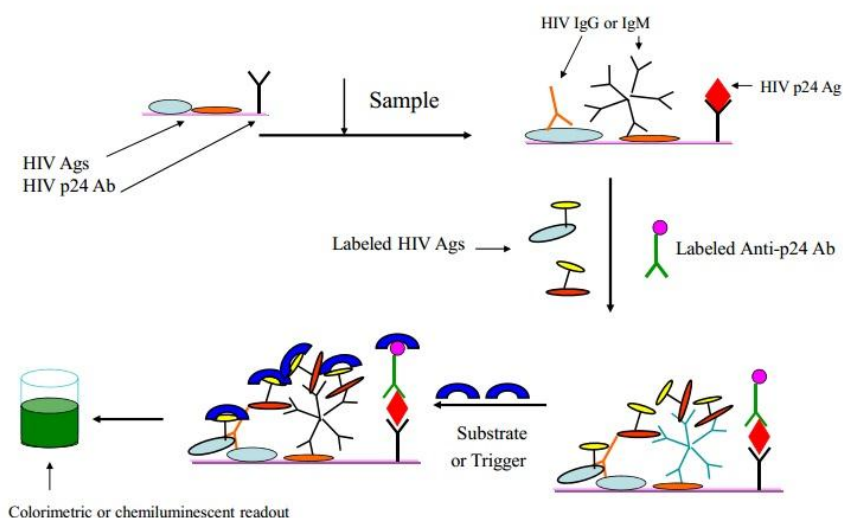
## 3rd Generation IA



รูปที่ 6 หลักการตรวจวินิจฉัยเอชไอวี 3<sup>rd</sup> generation EIA ใช้หลักการแอนติเจนแซนวิช คือ ตรึงแอนติเจนของเอชไอวีไว้ที่ solid phase และจับกับแอนติบอดีต่อเอชไอวี จากนั้นตรวจวัดด้วยแอนติเจนที่ติดฉลากแล้ว วิธีนี้สามารถตรวจเจอทั้ง IgG และ IgM (35)



## 4th Generation IA

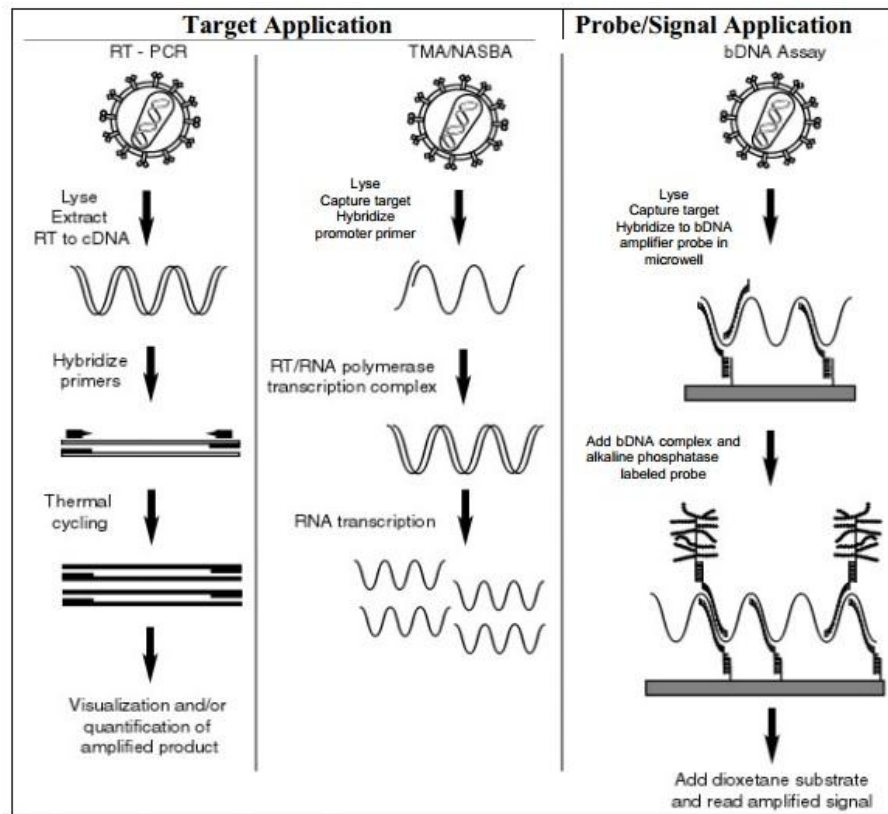


รูปที่ 7 หลักการตรวจวินิจฉัยเอชไอวี 4<sup>th</sup> generation EIA ที่ solid phase จะตรวจจับแอนติเจนและแอนติบอดีต่อโปรตีน HIV p24 ใน ทำให้สามารถตรวจหาทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีต่อเอชไอวี (35)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีโดยปกติการตรวจเลือดเพื่อหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีจะตรวจพบหลังจากรับเชื้อแล้วประมาณ 3-6 สัปดาห์ (49) การตรวจหาโปรตีนของไวรัส เป็นการตรวจหาโปรตีน p24 Antigen ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนแกนของไวรัส ซึ่งสามารถตรวจพบได้เร็วกว่าการตรวจหาแอนติบอดีประมาณ 5 วัน ทำให้การวินิจฉัยทำได้เร็วขึ้น เหมาะกับผู้ที่รับเชื้อมาใหม่แต่ยังไม่มีการสร้างแอนติบอดี (51) การตรวจหาเชื้อเอชไอวีของคลินิกนิรนาม สภากาชาดไทยจะใช้วิธีตรวจหลายวิธีร่วมกันดังนี้ ตรวจด้วยวิธี 4<sup>th</sup> generation EIA สามารถตรวจพบผลบวกได้หลังมีความเสี่ยงต่อการสัมผัสเชื้อมาประมาณ 3 สัปดาห์ขึ้นไป โดยผู้มารับบริการจะทราบผลการตรวจจากวิธี 4<sup>th</sup> generation EIA ประมาณ 1 ชั่วโมงหลังเจาะเลือด กรณีผลการตรวจ 4<sup>th</sup> generation EIA เป็นบวก ผู้มารับบริการจะได้รับการแจ้งผลบวกครั้งแรกจาก 4<sup>th</sup> generation EIA และจะได้รับการเจาะเลือดซ้ำอีกครั้ง เพื่อนำไปตรวจซ้ำด้วยชุดตรวจที่แตกต่างกันอีก 2 ชุด ถ้าผลการตรวจเป็นบวกอย่างน้อย 1 ชุดตรวจ ผู้มารับบริการจะได้รับการแจ้งยืนยันผลบวก กรณีผลการตรวจ 4<sup>th</sup> generation EIA เป็นลบตัวอย่างเลือดจะนำไปตรวจด้วยวิธี Nucleic acid Amplification Test (NAT) ต่อไป (52)

Western Blot เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีเช่นกันกับวิธี EIA แต่จะให้ความแม่นยำกว่าเนื่องมีการตรึงเมมเบรนด้วยแอนติเจนหลายชนิดกว่าวิธี EIA แอนติเจนที่ใช้ได้แก่ gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 และ p15 (35)

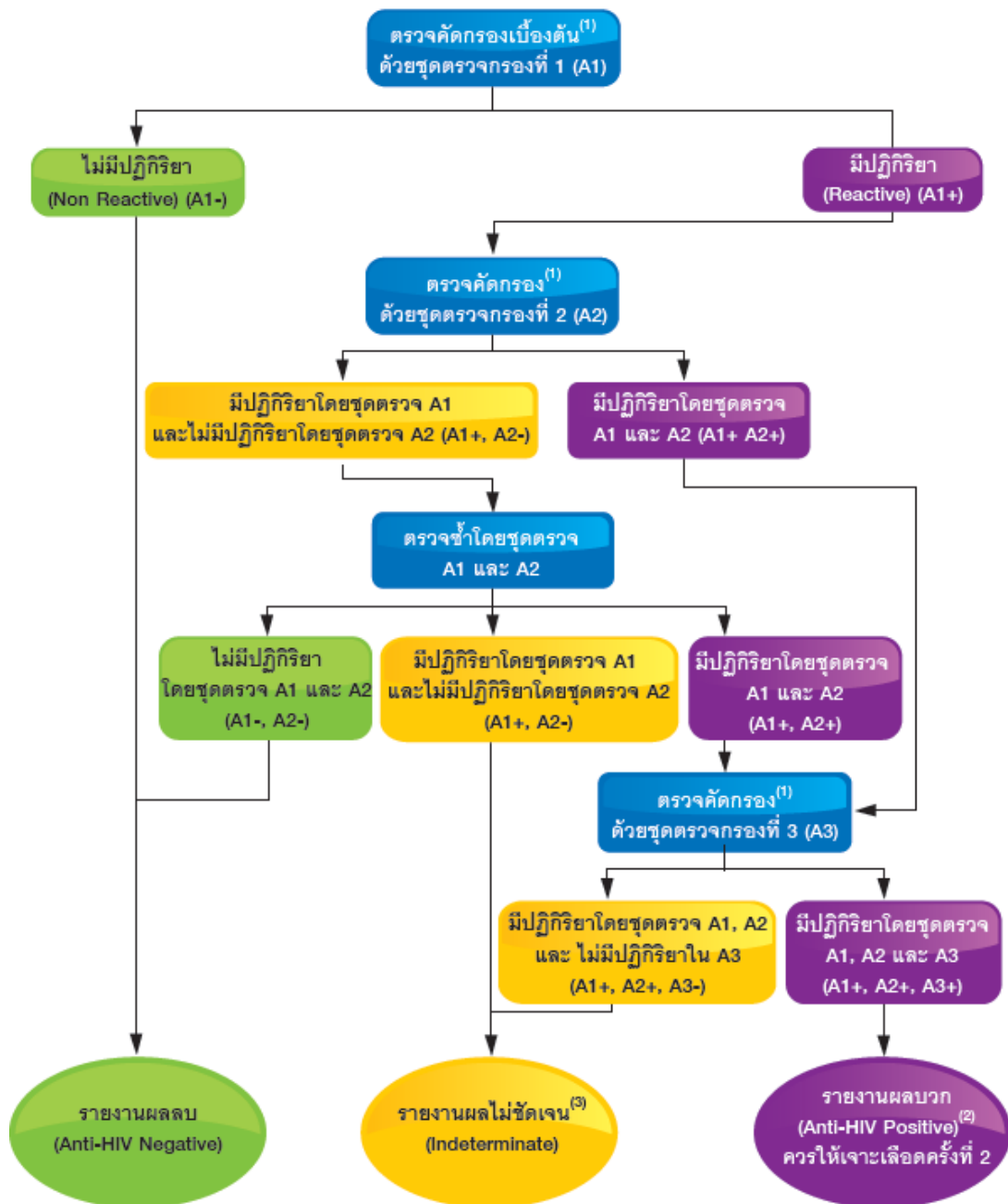
การตรวจหาเชื้อเอชไอวีโดยวิธี NAT เป็นการตรวจหาเชื้อเอชไอวีโดยตรง สามารถตรวจพบเชื้อได้หลังจากรับเชื้อมาแล้ว 5 วันขึ้นไป และสามารถตรวจได้ทั้งเชิงปริมาณเพื่อใช้ตรวจติดตามผลปริมาณไวรัสในเลือด และการตรวจเชิงคุณภาพเพื่อการวินิจฉัย (51) หลักการของวิธี NAT คือ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเอชไอวี ซึ่งสารพันธุกรรมของเอชไอวีมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ 1.) Viral RNA แต่ละอนุภาคของไวรัสมี Positive-single strand RNA อยู่ 2 ชุด โดยพบได้ในเซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวี และพบเป็นอนุภาคไวรัสในพลาสมา อนุภาคไวรัสในพลาสมาเป็นเป้าหมายหลักในการตรวจหาของวิธี NAT 2.) DNA ซึ่งสร้างจาก Viral RNA ด้วยวิธี Reverse Transcription และแทรกอยู่ในสารพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้าน หลักการวิธี NAT มีขั้นตอนดังนี้ 1.) Preamplification เป็นการเตรียมตัวอย่างและสกัดสารพันธุกรรมของเอชไอวี 2.) Amplification เป็นการเพิ่มจำนวนเป้าหมาย ซึ่งมี 2 แบบ ได้แก่ Target Amplification และ Probe/signal Amplification วิธีที่ใช้หลักการ Target Amplification ได้แก่ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Transcription Mediated Amplification (TMA) และ Nucleic acid Sequence-based Amplification วิธีที่ใช้หลักการ Probe/signal Amplification ได้แก่ Branched DNA (bDNA) และ Hybrid Capture Systems 3.) Detection เป็นขั้นตอนการตรวจวัดสัญญาณ ดังรูปที่ 8 (35)



รูปที่ 8 แสดงหลักการ NAT การสกัดสารพันธุกรรม การเพิ่มจำนวน และการตรวจวัดของวิธีต่างๆ (35)

การตรวจหาเชื้อเอชไอวีของคลินิกนิรนาม สภากาชาดไทย ถ้าผลการตรวจด้วยวิธี 4<sup>th</sup> generation EIA เป็นลบตัวอย่างเลือดจะถูกนำไปตรวจด้วยวิธี NAT ซึ่งเป็นการตรวจจับสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี ดังนั้นจึงมีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธี EIA และสามารถตรวจพบผลบวกได้หลังได้รับเชื้อมาประมาณ 5 วันขึ้นไป หากผล NAT เป็นลบจะไม่มีโทรศัพท์แจ้งผลกลับไปยังผู้รับบริการ แต่ถ้าผล NAT เป็นบวกซึ่งแปลว่าเป็นผู้ที่เพิ่งติดเชื้อ HIV ในระยะเฉียบพลัน ผู้ติดเชื้อจะได้รับการ ติดต่อกลับไปทางโทรศัพท์ เพื่อให้กลับมารับคำปรึกษาแนะนำเพิ่มเติม (52)

กระทรวงสาธารณสุขได้แนะนำการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีด้วยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเอชไอวีด้วยกลยุทธ์ตามแนวทางขององค์การอนามัยโลก โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูปตามหลักการของวิธี EIA จำนวน 3 ชุด เพื่อใช้ตรวจและแปลผล ซึ่งผลการตรวจสามารถรายงานผลบวกหรือลบแทนการตรวจด้วยวิธี Western Blot แนวทางของกระทรวงสาธารณสุข คือ ตรวจคัดกรองด้วยชุดตรวจที่ 1 แล้วผลการตรวจไม่มีปฏิกิริยาให้รายงานผลลบ แต่ถ้ามีปฏิกิริยาให้ตรวจซ้ำด้วยชุดตรวจที่ 2 ผลการตรวจไม่มีปฏิกิริยาให้ตรวจซ้ำโดยใช้ชุดตรวจเดิมคือชุดที่ 1 และ 2 แต่ถ้ามีปฏิกิริยาให้ตรวจซ้ำด้วยชุดตรวจที่ 3 และถ้าให้ผลการตรวจมีปฏิกิริยาทั้ง 3 ชุดให้รายงานผลเป็นบวก แต่ถ้ามีปฏิกิริยาในชุดที่ 1 และ 2 แต่ไม่มีปฏิกิริยาในชุดที่ 3 ให้รายงานผลเป็นเป็นไม่ชัดเจน (51) ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แนวทางการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ใหญ่และเด็กอายุ 18 เดือนขึ้นไป 1.) A1, A2 และ A3 หมายถึงชุดทดสอบชนิดที่ 1, 2 และ 3 ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ทั้งสามชุดใช้หลักการตรวจหาแอนติบอดีที่ต่างกันหรือมีแอนติเจนที่ผลิตด้วยวิธีแตกต่างกัน ชุดทดสอบที่ 1 มีความไวมากกว่าชุดทดสอบที่ 2 และ 3 2.) ก่อนแจ้งผลกับผู้ติดเชื้อรายใหม่ หรือตรวจเป็นครั้งแรกควรตรวจเลือดอีกครั้งอย่างน้อย 1 วิธี เพื่อยืนยันตัวบุคคลเจ้าของตัวอย่างตรวจ 3.) การรายงานผลไม่ชัดเจน (indeterminate) ให้ติดตามตรวจซ้ำภายหลัง 2 สัปดาห์ และในเดือนที่ 3 และ 6 หากยังได้ผลไม่ชัดเจนให้รายงานว่าผลไม่ชัดเจน (51)

การตรวจวินิจฉัยเพื่อติดตามผลการรักษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้ารับการรักษา โดยได้รับยาต้านไวรัสจะถูกตรวจติดตามผลการรักษาด้วยการตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด CD4+T cell การตรวจวัดปริมาณ CD4+T cell มีความสำคัญมากต่อการติดตามผลการตอบสนองต่อ ยาต้านไวรัส การตรวจ CD4+T cell count ด้วยวิธี Flow cytometry โดยย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ที่ จับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุล CD45, CD3 และ CD4 ค่าที่ได้จะเป็นร้อยละของ CD4+T cell และนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า Absolute CD4+T cell count โดยคำนวณจาก lymphocyte count ที่ได้จากค่า Complete blood count (CBC) (53, 54) นอกจากนี้ยังมีชุดตรวจ Truecount Method ที่มีค่า Absolute CD4+T cell count โดยไม่ต้องนำไปเทียบกับค่า lymphocyte count จาก CBC (55) การตรวจติดตามปริมาณ HIV viral load ใช้ตรวจครั้งแรกก่อนการรับยาต้านไวรัส และตรวจติดตามในเดือนที่ 3 และเดือนที่ 6 ในปีแรก ในปีต่อไปจะตรวจติดตามอย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง (54) และในผู้ที่มีปริมาณการเพิ่มขึ้นของ CD4+T cell หลังจากรับยาต้านไวรัสแล้วเพิ่มขึ้นปริมาณ เล็กน้อย จำเป็นต้องตรวจการตรวจวัด HIV viral load เพื่อใช้พิจารณาผลการตอบสนองต่อยาต้าน ไวรัส (56) วิธีการตรวจหา viral load ในปัจจุบัน Puren และคณะ ได้แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ NAT ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) และ European Economic Area (EEA) ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ Roche Amplicor HIV-1 Monitor test ซึ่ง ใช้หลักการของ PCR, bioMérieux NucliSENS EasyQ System HIV-1 QT test ซึ่งใช้หลักการของ NASBA และ Bayer Versant HIV-1 RNA bDNA test ซึ่งใช้หลักการของ bDNA กลุ่มที่ 2 คือวิธี In-House NAT หรือ Home-brew NAT และกลุ่มที่ 3 คือ Non-nucleic acid-based tests ได้แก่ วิธี Cavid ExaVir Load HIV-specific reverse-transcriptase activity assay และวิธีของ Perkin Elmer Ultrasensitive p24 antigen detection assay (57)

## 1.6 การป้องกันและการรักษา

เนื่องจากโรคเอดส์ติดต่อได้ 3 ช่องทาง คือ ทางเพศสัมพันธ์ ทางเลือด และทางแม่สู่ลูก ดังนั้น การป้องกันจึงทำได้ดังนี้ 1.) ควรใช้ถุงยางอนามัยในขณะร่วมเพศ ทั้ง รีกต่างเพศและชายรุกร่วมเพศ การสวมถุงยางอนามัยสามารถป้องกันการติดเชื้อเอชไอวีและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์อื่นๆ คิดเป็น อย่างน้อย 85% 2.) การเรียนรู้การใช้เข็มฉีดยาอย่างถูกวิธี 3.) ลดอัตราการติดเชื้อจากมารดาสู่ทารก WHO ได้แนะนำให้มีการป้องกันสำหรับผู้ป่วยกลุ่ม Mother-to-Child Transmission of HIV (MTCT) ซึ่งประกอบไปด้วย การให้ยาต้านไวรัสแม่และเด็กในขณะตั้งครรภ์และหลังคลอด จัดให้มีการ รักษาในระยะยาวสำหรับหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อโดยไม่คำนึงถึงจำนวนของ ปริมาณ CD4+T cell count 4.) ควรมีการตรวจการติดเชื้อและเข้ารับคำปรึกษา สำหรับผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยง (49) 5.) ในผู้ติด เชื้อควรได้รับยาต้านไวรัส ( Antiretroviral, ART) (49, 58) ซึ่งยาต้านไวรัสแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs), Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs), Protease Inhibitors (PIs), Integrase Inhibitors (INIs) และ Entry Inhibitors (59)

Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) เป็นยาที่สร้างด้วยการเปลี่ยนแปลง side chain ของ nucleosides (thymidine, adenosine และ cytidine) การออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้ต้องผ่านขบวนการ phosphorylation ภายในเซลล์จึงจะออกฤทธิ์ได้ กลไกการออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ การแย่งจับกับ HIV Reverse Transcriptase ปัจจุบันมียาที่ FDA รับรอง 8 ชนิด ได้แก่ abacavir (ABC, Ziagen), didanosine (ddl, Videx), emtricitabine (FTC, Emtriva), lamivudine (3TC, Epivir), stavudine (d4T, Zerit), zalcitabine (ddC, Hivid), zidovudine (AZT, Retrovir) และ Tenofovir disoproxil fumarate (TDF, Viread) (59)

Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) เป็นยาที่ออกฤทธิ์ไปจับกับ เอนไซม์ HIV-1 reverse transcriptase โดยเหนี่ยวนำการเปลี่ยนรูปโครงสร้างของตำแหน่งที่จับกับ ซับสเตรต (Substrate binding site) และลดการทำงานของเอนไซม์ Polymerase (60) ยาในกลุ่มนี้ต่างจากกลุ่ม NRTIs คือ ตัวยาจะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ reverse transcriptase ของ HIV-1 เท่านั้น จะไม่ออกฤทธิ์กับไวรัสอื่นที่อยู่ในจีโนม *Lentivirus* เช่น HIV-2 และ Simian Immunodeficiency Virus (SIV) (61) ปัจจุบันมียากลุ่ม NNRTIs ได้แก่ etravirine (ETR), delavirdine, efavirenz, rilpivirine (RPV) และ nevirapine (NVP) (59)

Protease Inhibitors (PIs) เป็นยาที่ออกฤทธิ์ขัดขวาง HIV-1 protease ซึ่งทำหน้าที่ตัดโปรตีน Gag และ Gag-Pol polyprotein ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้นในการรวมตัวเป็นไวรัสออน ยาที่ FDA รับรองมี 10 ชนิด ได้แก่ amprenavir (APV, Agenerase), atazanavir (ATZ, Reyataz), darunavir (TMC114, Prezista), fosamprenavir (Lexiva), indinavir (IDV, Crixivan), lopinavir (LPV), nelfinavir (NFV, Viracept), ritonavir (RTV, Norvir), saquinavir (SQV, Fortovase/Invirase) และ tipranavir (TPV, Aptivus) (59)

Integrase Inhibitors (INIs) เป็นยาที่ออกฤทธิ์ที่เอนไซม์ Integrase ของ HIV-1 โดยตัวยาจะจับเฉพาะกับเอนไซม์โครงสร้างของ Integrase และ ดีเอ็นเอของไวรัสเท่านั้นตัวยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ Raltegravir (RAL), MK-0518, Elvitegravir (EVG), และ GS-9137 (59)

Entry Inhibitors เป็นยาที่ออกฤทธิ์ขัดขวางการรวมกันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์กับไวรัส (Fusion Inhibitors) และ มีคุณสมบัติเป็น Small-Molecule CCR5 Antagonists โดยตัวยาจะจับกับ Hydrophobic pockets ในส่วนของ Transmembrane helices ของ CCR5 ซึ่งไม่ใช่ตำแหน่ง

Binding site ระหว่าง HIV-1 envelope กับ CCR5 แต่ตัวยาสสามารถขัดขวางการจับกันของ HIV-1 envelope กับ CCR5 ได้ แต่ไม่ขัดขวางการจับกันของ Chemokines ต่างๆ ของร่างกาย ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ VCV, Maraviroc (MVC) และ Aplaviroc (59) Enfuvirtide (ENF) (51)

การเริ่มรับยาต้านไวรัสในประเทศไทย มีหลักการพิจารณาจากระดับของ CD4+ count และ ปริมาณ viral load อาการแสดงของโรคเอดส์ และการตั้งครรภ์ ซึ่งการรักษาด้วยยาต้านไวรัสมี เป้าหมายของการรักษาเพื่อลดปริมาณของ viral load ให้ต่ำที่สุดและนานที่สุด รวมทั้งให้ระดับ CD4+ count กลับสู่ระดับปกติให้มากที่สุด ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยไม่เสี่ยงต่อโรคแทรกซ้อนต่างๆ ดังนั้น หากผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีอาการของโรคเอดส์จะเริ่มให้ยาทันที หากผู้ติดเชื้อเอชไอวีไม่มีอาการของโรค เอดส์และค่า CD4+ count น้อยกว่าหรือเท่ากับ 350 เซลล์ต่อไมโครลิตร จะเริ่มให้ยาทันที หากผู้ติด เชื้อเอชไอวีไม่มีอาการของโรคเอดส์และค่า CD4+ count มากกว่า 350 เซลล์ต่อไมโครลิตร ยังไม่เริ่ม จ่ายยาต้านไวรัสแต่มีการตรวจติดตามทุกๆ 6 เดือน ในกรณีของหญิงมีครรภ์ให้เริ่มให้ยาทันที (51)

สูตรยาที่แนะนำใช้อันดับแรกในประเทศไทยคือ ยาในกลุ่ม NRTIs และ NNRTIs การใช้ยาสูตร PIs จะใช้แทนยาในสูตร NNRTIs เมื่อมีอาการผลข้างเคียงจากยากกลุ่ม NNRTIs สูตรยา NRTIs ที่ แนะนำ คือ AZT+3TC และ TDF+3TC/FTC หรือสูตรยา NRTIs ทางเลือก คือ ABC+3TC, d4T+3TC และ ddi+3TC ยากกลุ่ม NNRTIs ที่แนะนำ คือ EFV และ NVP กรณีเกิดผลข้างเคียงจาก ยากกลุ่ม NNRTIs จะเปลี่ยนเป็นยากกลุ่ม PIs ยาที่แนะนำ คือ LPV/r หรือยาทางเลือกกลุ่ม PIs คือ AVT/r, DRV/r และ SQV/r นอกจากนี้กระทรวงสาธารณสุขผลิตยาต้านไวรัสชื่อ จีพีโอเวียร์เอส (GPO VIR S) ซึ่งประกอบด้วยยา d4T+3TC+NVP (51)

## 2. โรคตับอักเสบซี

โรคตับอักเสบ คือ ภาวะที่มีการอักเสบของเซลล์ตับ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis A Virus, HAV) ไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B Virus, HBV) ไวรัสตับ อักเสบซี (Hepatitis C Virus, HCV) ไวรัสตับอักเสบดี (Hepatitis D Virus) และไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis E Virus) เกิดการทำลายเซลล์ตับ ทำให้เซลล์ตับทำหน้าที่ผิดปกติ ส่งผลให้ร่างกาย เจ็บป่วย ไม่สบาย มีการจุกแน่นที่บริเวณตับ ไวรัสตับอักเสบบีและซีทำให้เกิดการเจ็บป่วยเรื้อรัง ได้แก่ ไวรัสตับอักเสบบี และไวรัสตับอักเสบบี (62) ไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบบีใน มนุษย์ที่ไม่ได้มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การติดเชื้อไวรัสตับ อักเสบซีจะทำให้เกิดโรคตับแข็ง (Cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (Hepatocellular Carcinoma, HCC) (63)

## 2.1 ประวัติการค้นพบไวรัสตับอักเสบซี

ในปี พ.ศ. 2532 นักวิจัยจากบริษัท Chiron ชื่อ Michael Houghton และคณะ ได้ค้นพบส่วนของหน่วยพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี และพัฒนาวิธีการทดสอบหาแอนติบอดีเฉพาะอย่างได้ตลอดจนพัฒนาการทดสอบ Enzyme Immunoassay ชนิดแรกประสบผลสำเร็จและได้รับการพัฒนาจนสามารถนำมาใช้ตรวจเลือดและอวัยวะที่จะใช้ปลูกถ่ายเป็นผลสำเร็จในปี พ.ศ. 2533 และในปี พ.ศ. 2538 นักวิทยาศาสตร์สามารถมองเห็นรูปร่างของไวรัสตับอักเสบซีภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้ (14)

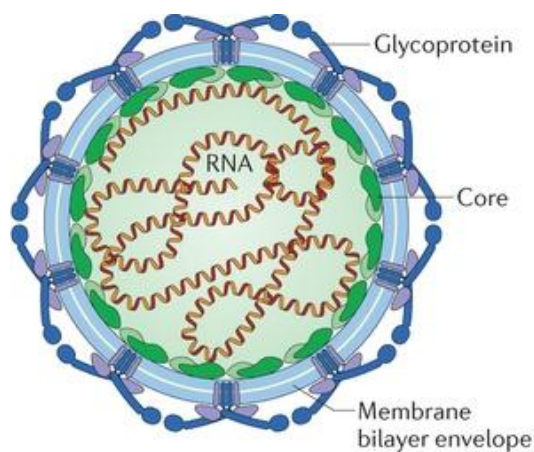
## 2.2 โครงสร้างและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี

ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C Virus, HCV) เป็นอาร์เอ็นเอไวรัสสายบวก (positive-stranded RNA Virus) โครงสร้างมีเปลือกหุ้มจัดอยู่ใน Family *Flaviviridae* และจัดอยู่ใน Genus *Hepacivirus* (64) มีขนาดประมาณ 55-65 นาโนเมตร เป็นรูปทรงกลม และมีเปลือกหุ้ม (enveloped) (63) ดังรูปที่ 10 เชื้อไวรัสตับอักเสบซีมีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอขนาดประมาณ 9.6 กิโลเบส สร้างโปรตีนประมาณ 10 ชนิด ได้แก่ Core, envelope 1 (E1), E2, p7, nonstructural (NS) 2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, และ NS5B (65) ดังรูปที่ 11 การเข้าสู่เซลล์ตับของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีอาศัย Receptor ที่หลากหลายดังนี้ CD81, Scavenger Receptor B type I (SR-BI), โปรตีน Claudin และ Occludin บนผิวของเซลล์ตับ นอกจากนี้ไวรัสตับอักเสบซียังจับกับโมเลกุลอื่นๆ ได้แก่ Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN, CD209), Low-Density lipoprotein (LDL) receptor (LDL-R), Asialoglycoprotein Receptor (ASGP-R), Glycosaminoglycan (GAG) แต่โมเลกุลเหล่านี้ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการเข้าสู่เซลล์ (64, 66) กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบซีเกิดขึ้นในไซโตซอลของเซลล์ตับ การสังเคราะห์โปรตีนเริ่มต้นที่ 5' untranslated region (UTR) ได้โปรตีนขนาดประมาณ 3,000 amino acids โปรตีนนี้จะถูกตัดโดยเอนไซม์ของไวรัสและเซลล์เจ้าบ้าน และได้โปรตีนโครงสร้างและไม่ใช้โครงสร้าง 10 ชนิด จากนั้นโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างจะทำหน้าที่สร้างอาร์เอ็นเอสายลบ อาร์เอ็นเอสายบวก และส่วนประกอบต่างๆ จากนั้น Capsid proteins และอาร์เอ็นเอสายบวกจะรวมกันเป็น Nucleocapsid และออกสู่ไซโตพลาสซึมโดยการ Budding ซึ่งทำให้ Nucleocapsid ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์เป็นไวรัสตับอักเสบซีที่สมบูรณ์ (64)

การจำแนกกลุ่มของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบ่งเป็น 6 สายพันธุ์หลัก (Genotype) สายพันธุ์ 1-3 พบได้ทั่วโลก สายพันธุ์ 4-5 พบได้ในทวีปแอฟริกา สายพันธุ์ 6 พบในเอเชีย สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยคือ สายพันธุ์ 1, 3 และ 6 นอกจากสายพันธุ์หลักแล้วยังสามารถจำแนกได้มากกว่า 100 subtypes (14, 65) แต่ละสายพันธุ์มีความหลากหลายทางชีวภาพในแง่ของการกลายพันธุ์ และความ

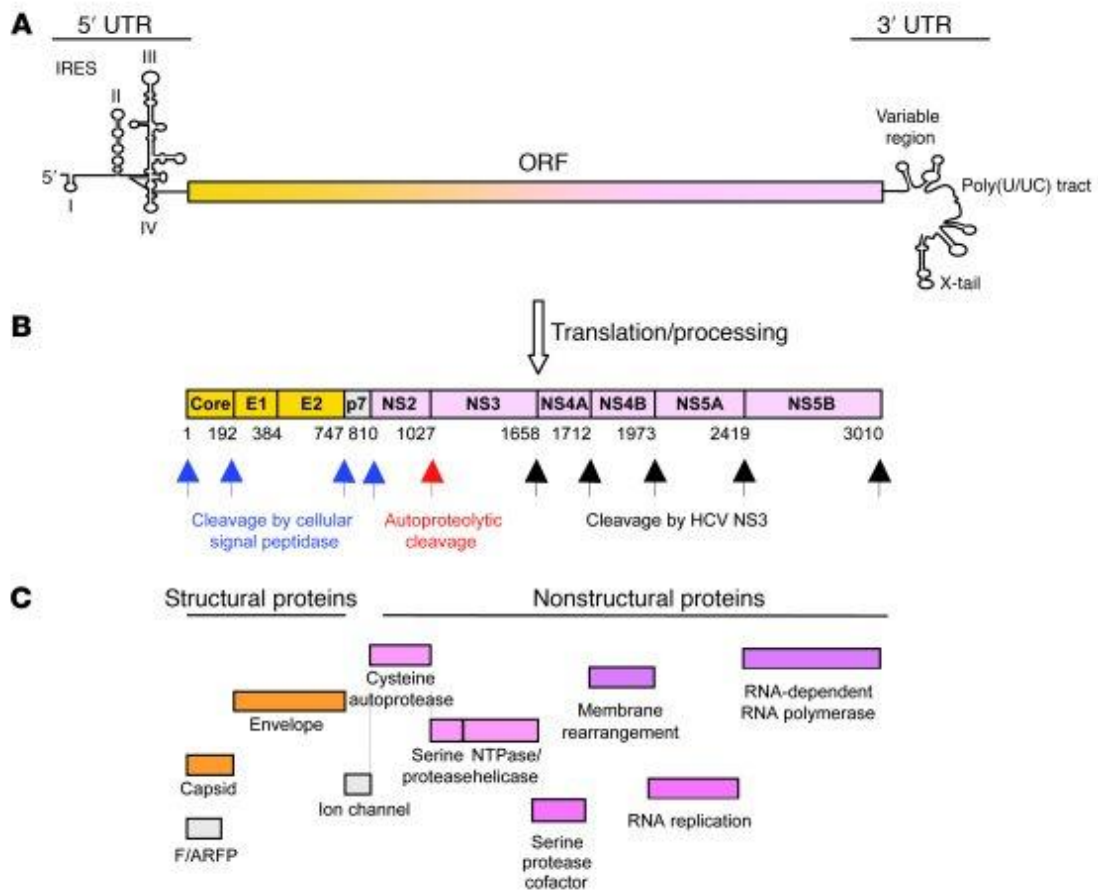


รุนแรงที่เกิดขึ้นกับตัว แม้ในผู้ติดเชื้อรายเดียวยังสามารถพบสายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกันแต่มีความแตกต่างกันเพียงบางส่วน เรียก *Quasispecies* และเมื่อเวลาผ่านไปความแปรปรวน และความแตกต่างของ *Quasispecies* จะมากขึ้น (14)



รูปที่ 10 อนุภาคไวรัสตับอักเสบซี แสดงส่วนประกอบของอนุภาค ได้แก่ Viral RNA, Core Protein ซึ่งอยู่ในชั้นของ Nucleocapsid, Membrane Bilayer Envelope และ E1-E2 Surface Glycoprotein (67)





รูปที่ 11 แสดงส่วนประกอบของสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบซี A.) คือ single-stranded RNA แสดงให้เห็นส่วนประกอบคือ open reading frame (ORF) และปลาย UTRs ทั้งสอง กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนจะเริ่มที่ปลาย 5' UTR, uridine และ cytidine B.) แสดงยีนต่างๆ ที่สังเคราะห์โปรตีน กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนต้องอาศัยเอนไซม์ของไวรัสและของเซลล์เจ้า C.) โปรตีน 10 ชนิดที่สร้างขึ้น ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างและไม่ใช่โครงสร้างของไวรัส (64)

### 2.3 การติดต่อของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี

เชื้อไวรัสตับอักเสบซีเป็นโรคติดต่อทางเลือด (Blood Borne Diseases) การติดต่อมีหลายช่องทาง คือ การได้รับหรือสัมผัสกับเลือดของผู้ป่วยหรือผู้ติดเชื้อ การติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน และ การติดต่อจากแม่สู่ลูกผ่านทางรก (10, 11, 68, 69) ช่องทางการติดต่อที่สำคัญของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ได้แก่ การได้รับเลือด โดยเฉพาะการได้รับเลือดหรือส่วนประกอบของเลือด ก่อนปี พ.ศ. 2538 ซึ่งไม่มีการตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในเลือดที่รับบริจาคมา อีกช่องทางการติดต่อที่พบมากคือ การรับยาทางหลอดเลือดดำ (Intravenous Drug Use, IVDU) พบว่าผู้ที่มีประวัติการรับยาทางหลอดเลือดดำนานกว่า 6 เดือน มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี มากกว่า 95% (70)

การศึกษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 3111 ราย แบ่งเป็นผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd จำนวน 1157 ราย พบว่ามีประวัติการได้รับยาทางหลอดเลือด มากถึง 1015 ราย (87.7%) ขณะที่ผู้ติดเชื้อ HIV monoinfected จำนวน 1954 ราย มีประวัติการรับยาทางหลอดเลือดเพียง 93 ราย (4.8%) (71) เช่นเดียวกับรายงานของ Yacisin และคณะ ก็พบว่าผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd มีประวัติ IVDU มากถึง 85.6% ขณะที่ HIV monoinfected มีเพียง 15.3% (72) เชื้อไวรัสตับอักเสบบีไม่สามารถติดต่อทางการให้นมลูก การรับประทานอาหารและน้ำดื่มร่วมกันได้ บุคคลที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ คือ บุคคลที่ได้รับการถ่ายเลือด หรือใช้เครื่องมือทางการแพทย์หรือกิจกรรมที่มีโอกาสติดเชื้อ ทารกที่มีมารดาติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การมีเพศสัมพันธ์กับคู่นอนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี และผู้ที่มีรอยสัก (69)

## 2.4 ลักษณะอาการโรคตับอักเสบบี

เชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีระยะการฟักตัวประมาณ 2 สัปดาห์ ถึง 6 เดือนหลังจากได้รับเชื้อ มีผู้ติดเชื้อประมาณ 80% ที่ไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น โรคไวรัสตับอักเสบบีแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดเฉียบพลัน (Acute Hepatitis Infection) และชนิดเรื้อรัง (Chronic Hepatitis Infection) (69) ผู้ป่วยตับอักเสบบีจากไวรัสตับอักเสบบี ส่วนใหญ่จะมีระดับของเอนไซม์ Alanine aminotransferase หรือ ALT เพิ่มขึ้นเป็นครั้งคราว แต่ไม่สูงมากและมักไม่มีติชาน และประมาณ 40-60% จะเป็นเรื้อรังและกลายเป็นตับอักเสบบีเรื้อรังหรือตับแข็ง อาการของโรคจะดำเนินไปอย่างช้าๆ บางรายยาวนาน 20-30 ปี นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิดมะเร็งตับตามมาหลังจากที่ผู้ป่วยติดเชื้อเป็นเวลานาน (73) อาการของโรคที่พบ คือ มีไข้ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ปวดชายโครงขวา ปวดกล้ามเนื้อและปวดข้อ ปัสสาวะมีสีเข้ม อุจจาระมีสีเทา ปวดข้อ และมีอาการติชาน (69, 73) และพบว่า 20% ของผู้ป่วยชนิดเรื้อรังจะเป็นโรคตับแข็งและอาจเป็นมะเร็งตับ (74) ซึ่งจะมีอาการ คือ ตับและม้ามโต ตัวเหลืองตาเหลือง กล้ามเนื้อลีบ ท้องมาน และเท้าบวม (73)

เมื่อผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะทำให้เกิดโรคต่างๆ ตามมาดังนี้ 1.) ตับอักเสบบีเฉียบพลัน หลังจากไวรัสตับอักเสบบี เข้าสู่ร่างกายแล้วจะทำให้เกิดอาการอักเสบของตับ แต่ส่วนมากผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการ มีเพียงประมาณ 25-30% ที่จะแสดงอาการติชาน หรือตัวเหลืองและตาเหลือง ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่จะไม่ว่าตนเองเป็นไวรัสตับอักเสบบีชนิดเฉียบพลัน 2.) ตับอักเสบบีเรื้อรัง พบว่ามากกว่า 60% ของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี จะเกิดภาวะตับอักเสบบีเรื้อรัง ซึ่งในระยะแรกผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการ แต่เมื่อมีการทำลายตับไปมากพอสมควรหรือเกิดการอักเสบของตับมากแล้ว ค่อยแสดงอาการ ซึ่งผู้ป่วยอาจมีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร เป็นต้น 3.) ตับแข็ง ผู้ป่วยตับอักเสบบีจากไวรัสตับอักเสบบี ตับจะมีอาการอักเสบและถูกทำลายไปเรื่อยๆ จนในที่สุดจะกลายเป็นตับแข็ง ซึ่งถ้าเป็นมาก ผู้ป่วยอาจมีอาการอ่อนเพลียมาก ติชาน ท้องมานและเกิดตับวายได้ในที่สุด 4.) มะเร็งตับ ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี จะมีโอกาสเป็นมะเร็งตับได้มากกว่าคนปกติ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าถ้าผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างถูกต้องจะสามารถลดโอกาสการเกิดมะเร็งตับได้ (73)

## 2.5 การตรวจวินิจฉัย

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ

### 2.5.1 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Anti-HCV)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยใช้วิธี Enzyme Immuno assay (EIA) การตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย ปัจจุบัน มี 3 รุ่น คือ

รุ่นที่ 1 EIA-1 ใช้แอนติเจนในส่วน NS4 ทำให้มีความไวและความจำเพาะต่ำที่สุด

รุ่นที่ 2 EIA-2 ได้เพิ่มการตรวจหาแอนติเจนในส่วน Core และ NS3 เพิ่มเติมจากรุ่นที่ 1

รุ่นที่ 3 EIA-3 ได้เพิ่มการตรวจหาแอนติเจนในส่วน NS5 เพิ่มเติมจากรุ่นที่ 2 ทำให้มีความไวและความจำเพาะเพิ่มมากขึ้น และยังทำให้การตรวจพบเชื้อเร็วขึ้นในระยะเฉียบพลัน การตรวจด้วยวิธีนี้เหมาะกับกลุ่มผู้ป่วยที่มีโอกาสเสี่ยงติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสูง และกลุ่มที่มีการทำงานของตับผิดปกติ โดยวิธีการตรวจนี้มีความไวสูงถึง 92-95% และมีความจำเพาะถึง 88-95% ขณะที่ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอัตราเสี่ยงต่ำจะมีค่า positive predictive value ต่ำเพียง 50-61% เท่านั้น ดังนั้นจึงไม่ควรใช้การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในการตรวจ สำหรับบุคคลทั่วไป เช่น การตรวจสุขภาพประจำปี (75)

บุคคลที่ควรได้รับการตรวจคัดกรองว่ามีไวรัสตับอักเสบบีด้วยการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี คือ ผู้ที่มีประวัติได้รับเลือดหรือส่วนประกอบของเลือดก่อนปี พ.ศ. 2538 ซึ่งยังไม่มี การตรวจคัดกรองหาไวรัสตับอักเสบบีในเลือดที่ได้รับบริจาคมา ผู้ติดเชื้อเอชไอวี ผู้ที่เคยฟอกเลือด ด้วยเครื่องไตเทียม ผู้ที่มีผลการตรวจเลือดพบการอักเสบของตับ ผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ ก่อน ปี พ.ศ. 2538 เด็กที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี บุคลากรทางการแพทย์ที่ถูกเข็มตำ และสัมผัสเลือดจากผู้ป่วยตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง ผู้ที่เคยมีเพศสัมพันธ์กับผู้ป่วยตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง (75)

### 2.5.2 การตรวจหาสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เป็นการตรวจหาอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในพลาสมา หรือซีรัมของผู้ป่วย โดยใช้เทคนิคทาง PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง โดยสามารถตรวจที่จำนวนต่ำสุดถึงระดับ 10 IU ต่อ มิลลิลิตร (76) สามารถตรวจหาทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้ตรวจเพื่อติดตาม ประเมินผู้ป่วยเรื้อรังได้ดังตารางที่ 1 การเก็บตัวอย่างเลือดส่งตรวจไม่ควรใช้สารกันการแข็งตัวของ เลือดชนิด heparin เนื่องจากสารดังกล่าวจะยับยั้งปฏิกิริยา PCR (75, 77)

ตารางที่ 1 ชุดตรวจที่องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้ตรวจหาอาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีเชิงคุณภาพ (76)

ชื่อชุดทดสอบและบริษัทที่ผลิต	วิธีตรวจ	ค่าต่ำสุดที่ตรวจได้ (IU/มิลลิลิตร)	จุดประสงค์การตรวจ
Amplicor HCV v2.0 (Roche Molecular Systems)	Manual RT-PCR	50	ตรวจวินิจฉัย และตรวจติดตามผล
Cobas Amplicor HCV v2.0 (Roche Molecular Systems)	Semi-automated RT-PCR	50	ตรวจวินิจฉัย และตรวจติดตามผล
Ampliscreen (Roche Molecular Systems)	Semi-automated RT-PCR	<50	ตรวจคัดกรอง
Versant HCV RNA Qualitative Assay, (Siemens Healthcare Diagnostics)	Semi-automated TMA	10	ตรวจวินิจฉัย และตรวจติดตามผล
Procleix HIV-1/HCV Assay (Chiron Corporation)	Manual TMA	<50	ตรวจคัดกรอง

\* RT-PCR หมายถึง reverse transcription polymerase chain reaction และ TMA หมายถึง transcription-mediated amplification

### 2.5.3 การตรวจเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี

เนื่องจากการหาสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี มีความสำคัญต่อการประเมินการตอบสนองต่อการรักษา สายพันธุ์ไวรัสตับอักเสบบีที่สำคัญมี 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 1-6 ในประเทศไทยสายพันธุ์หลักของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี คือ สายพันธุ์ 1, 3 และ 6 มาตรฐานของวิธีตรวจ คือ Phylogenetic Analysis หรือวิธี Direct sequencing หรือวิธี Line probe assay การเลือกใช้วิธีตรวจควรดูว่าการตรวจนั้นสามารถตรวจได้ทุกสายพันธุ์หรือไม่ เพราะบางชุดตรวจอาจตรวจสายพันธุ์ที่ 6 ไม่ได้ และให้ผลการตรวจเป็นสายพันธุ์ที่ 1 (75)

## 2.6 การป้องกันและการรักษา

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการในระยะเฉียบพลัน แต่มักแสดงอาการป่วยแบบเรื้อรัง การติดเชื้อเป็นเวลานาน 20-30 ปี จะเกิดภาวะแทรกซ้อนจากภาวะตับแข็ง

และมะเร็งตับ เป้าหมายของการรักษาคือ การกำจัดเชื้อให้หายขาดอย่างถาวร ทำให้การอักเสบของตับเข้าสู่ภาวะปกติ พยาธิสภาพของตับดีขึ้น คุณภาพชีวิตดีขึ้น และป้องกันการเกิดอาการตับแข็งและมะเร็งตับ จากการศึกษาพบว่า หลังจากหยุดการรักษาแล้ว 24 สัปดาห์ และผลตรวจไม่พบเชื้อไวรัสแล้วพบว่า 99% ตรวจไม่พบเชื้ออีก แม้ว่าหลังการหยุดรักษาแล้ว 5 ปี โรคแทรกซ้อนลดลง และพยาธิสภาพของตับดีขึ้น อย่างไรก็ตามการรักษานี้ไม่ได้ผลกับทุกคน การดำเนินของโรคแตกต่างกันในแต่ละบุคคล บางรายอาจเกิดภาวะแทรกซ้อนหรืออาการข้างเคียงจากการรักษา นอกจากนี้แล้วยังมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่แพงมาก ในผู้ติดเชื้อบางรายอาจไม่แสดงอาการของโรค และไม่มีการเจ็บป่วยใดๆ เลย (75)

ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีที่ควรได้รับการรักษา ได้แก่ ผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป เนื่องจากผู้ป่วยที่อายุต่ำกว่า 18 ปี มีโอกาสหายเองและการดำเนินโรคช้า นอกจากนี้การรักษาอาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตได้ ผู้ที่มีผลการตรวจอาร์เอ็นเอไวรัสตับอักเสบบีเป็นบวก ผู้ที่ผลการเจาะตับพบว่ามีพังผืด ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ 1, 4 และ 6 เนื่องจากต้องใช้เวลารักษานาน 1 ปี และผู้ป่วยที่ยังไม่เป็นตับแข็งระยะรุนแรง (75)

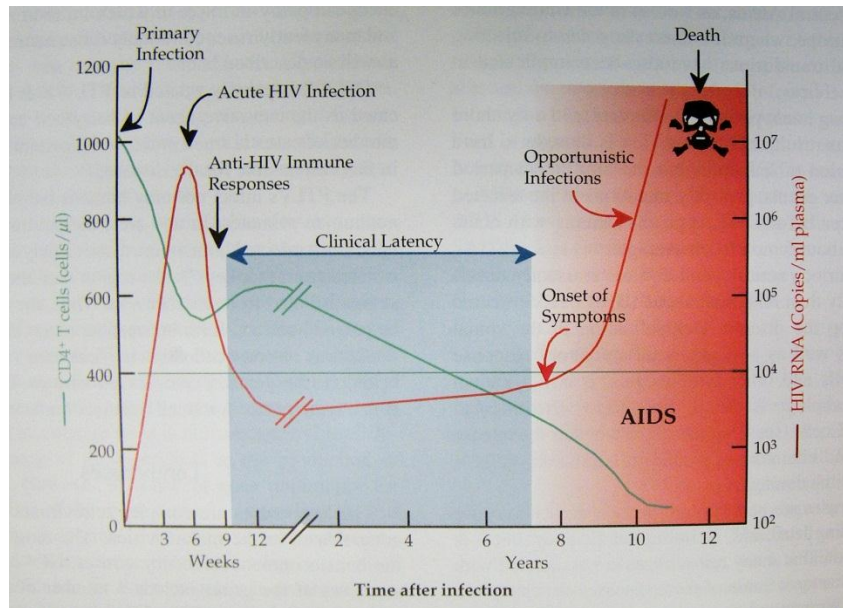
มาตรฐานการรักษาในปัจจุบันคือ ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ที่ 2 และ 3 ให้รับประทานยา Ribavirin ขนาด 800 มิลลิกรัม ต่อวัน ร่วมกับการใช้ Pegylated interferon alfa-2a 180 ไมโครกรัม (78, 79) หรือ Pegylated interferon alfa-2b 1.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อสัปดาห์ (80) สำหรับผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ที่ 1, 4-6 ให้ใช้ Pegylated interferon alfa-2a ขนาด 180 ไมโครกรัม ร่วมกับการรับประทานยา Ribavirin 1,000- 1,200 มิลลิกรัม ต่อวัน และหากใช้ Pegylated interferon alfa-2b ให้ใช้ยา ribavirin ตามน้ำหนักตัวคือ 800 มิลลิกรัม สำหรับน้ำหนักตัวน้อยกว่า 65 กิโลกรัม 1,000 มิลลิกรัม สำหรับน้ำหนักตัว 65-85 กิโลกรัม 1,200 มิลลิกรัม สำหรับน้ำหนักตัว 85-105 กิโลกรัม และ 1,400 มิลลิกรัม สำหรับน้ำหนักตัวมากกว่า 105 กิโลกรัม นอกจากนี้ในระหว่างการรักษาควรได้รับการตรวจปริมาณอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วย หากพบว่าไม่ลดลงน้อยกว่า  $2 \log_{10}$  ที่ 12 สัปดาห์ หรือตรวจพบมากกว่า 50 IU ต่อ มิลลิลิตร ที่ 24 สัปดาห์ก็ควรหยุดยา เพราะแม้ให้ยาต่อจนครบก็มีอัตราการหายขาดเพียง 2% และเมื่อการรักษาครบแล้ว ต้องตรวจยืนยันผลปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีอีกครั้งหลังการหยุดยาแล้ว 24 สัปดาห์ (78-80)

### 3. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

#### 3.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวี

##### 3.1.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อระยะเฉียบพลัน

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเอชไอวีในระยะแรกหลังการติดเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญในการบ่งชี้ถึงอาการทางคลินิกที่จะตามมา การตอบสนองที่มีประสิทธิภาพในระยะแรกๆ เท่านั้นที่จะสามารถควบคุมไวรัสในกระแสเลือดในระยะเฉียบพลันได้อย่างดี การตอบสนองช่วงแรกของการติดเชื้อนั้นเป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ทั้งส่วนที่เป็นสารน้ำและเซลล์จะมีกลไกการตอบสนองที่สูงมาก เป็นการต่อสู้กับเชื้อไวรัสที่กำลังทำลายเซลล์เจ้าบ้าน และการสร้างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลายลงไป จากการศึกษาซีรัมของผู้บริจาคโลหิตตั้งแต่ระยะก่อนการติดเชื้อ ระยะที่ตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสเอชไอวีเป็นครั้งแรก ระยะที่พบว่ามีการเพิ่มของเชื้อไวรัสเอชไอวีสูงสุด จนถึงระยะที่ตรวจพบแอนติบอดี พบว่าระยะแรกของการติดเชื้อไวรัส จะมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ C reactive protein, Serum amyloid, Fibrinogen และ complement ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผลิตจากตับเข้าสู่กระแสเลือดในปริมาณต่างๆ เมื่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันถูกกระตุ้นด้วย Cytokine ระดับของ Cytokine ชนิดต่างๆ ก็เพิ่มขึ้นด้วย เช่น Interleukine (IL)-15, Interferon (IFN)- $\alpha$  และ CXCL-10 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เป็นการเพิ่มขึ้นแบบชั่วคราว ขณะที่ IL-18, IL-22, IFN-gamma, Tumor Necrosis Factor (TNF) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงอยู่ในระดับสูงเป็นเวลานาน IL-10 จะเพิ่มซ้ำ IFN- $\alpha$ , IL-15 และ IL18 ส่งเสริมการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และแบบจำเพาะ แต่ผลข้างเคียงคือ สารเหล่านี้อาจกระตุ้นการเกิดพยาธิสภาพในผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้ (13)



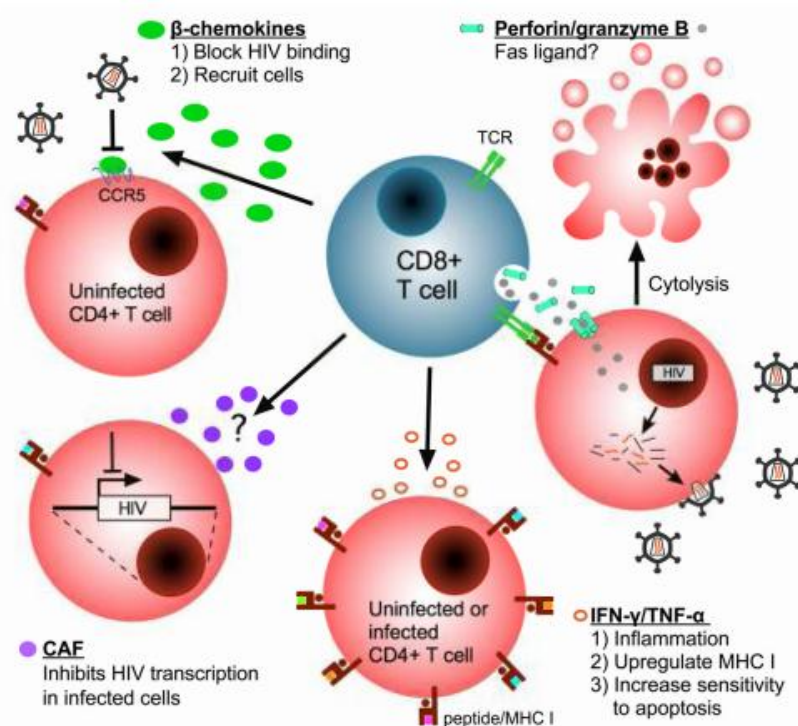
รูปที่ 12 ปริมาณไวรัสเอชไอวีและปริมาณ CD4+T cell ในช่วงเวลาต่างๆ หลังการติดเชื้อเอชไอวี ช่วงแรกของการติดเชื้อเอชไอวีปริมาณไวรัสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และลดลงเมื่อร่างกายเริ่มสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอชไอวี ระยะ Latency ภูมิคุ้มกันจะต่อสู้กับเชื้อเอชไอวีและควบคุมปริมาณเชื้อได้ จนกระทั่งปริมาณ CD4+T cell ลดลงต่ำมากๆ ปริมาณไวรัสจะเพิ่มขึ้นและร่างกายเริ่มแสดงอาการของโรคเอดส์ หลังจากนั้นจะเริ่มติดเชื้อฉวยโอกาสและเสียชีวิตในที่สุด (33)

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะชนิด CD8+T cell ในระยะแรกของการติดเชื้อเอชไอวีแบบเฉียบพลัน สามารถตรวจพบก่อนการปรากฏของแอนติบอดีจำเพาะ และเกิดขึ้นขณะที่ปริมาณไวรัสในกระแสเลือดกำลังสูงสุด และมักตอบสนองต่อ epitope เด่นๆ ของโปรตีน Nef และ Gag จำนวน 1-3 epitope การตอบสนองนี้จะพบสูงสุดใน 1-2 สัปดาห์หลังการตอบสนองครั้งแรก ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันกับที่ปริมาณไวรัสในกระแสเลือดลดลงจนเข้าสู่จุดกำหนดของไวรัส (Viral set point คือ จุดที่ไวรัสในพลาสมาลดลงจนถึงระดับเสถียรโดยใช้เวลา 3-6 เดือนหลังการติดเชื้อ) การกลายพันธุ์ของ HIV เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในเวลานี้ เนื่องจากถูกกดดันจากการฆ่าทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดย CD8+T cell การตอบสนองอย่างมีประสิทธิภาพของ CD8+T cell เกิดขึ้นได้เนื่องจากการสนับสนุนของ CD4+T cell ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมากในระยะแรกของการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน และลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น ส่งผลให้การตอบสนองของ CD8+T cell ลดลงตามด้วย CD8+T cell จะตอบสนองแบบจำเพาะต่อโปรตีน Env, Nef และ Gag การตอบสนองต่อโปรตีน Gag จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่วนการตอบสนองต่อโปรตีน Pol นั้นจะเกิดขึ้นภายหลัง (13)



### 3.1.2 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

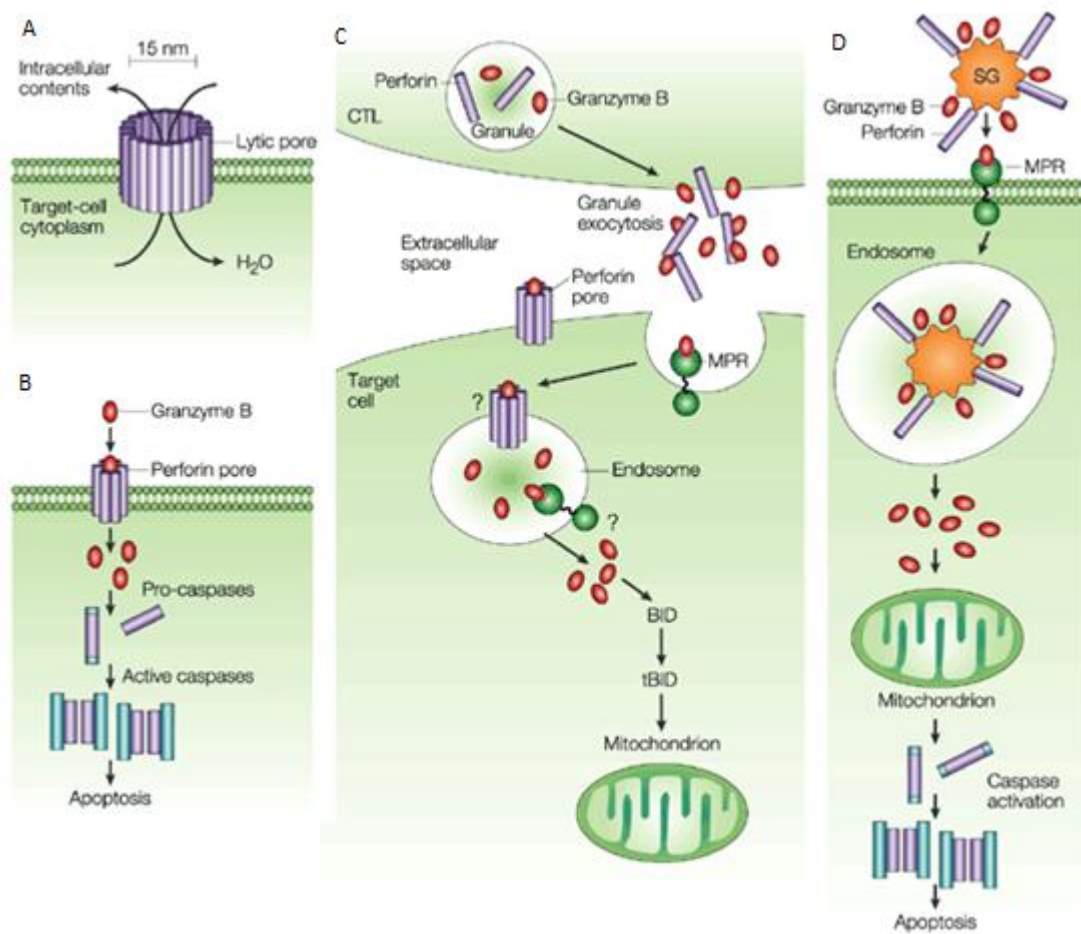
ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive Immune System) เป็นภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างมา ป้องกันการรุกรานของจุลชีพ ภูมิคุ้มกันชนิดนี้มีพื้นฐานของการสร้าง Clone ของ Lymphocyte ที่มีความหลากหลายของ receptor ที่ผิวเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันเรียนรู้และจดจำแอนติเจนแปลกปลอมได้ทุกชนิด Lymphocyte ที่จำเพาะต่อแอนติเจนจะเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็น Effector cell เพื่อทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคนั้นๆ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อ Lymphocyte บางกลุ่มให้มีความจำเกิดขึ้น คือ ปรับเปลี่ยนตัวเองไปเป็น Memory Lymphocyte ทำให้เกิดการตอบสนองที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในครั้งต่อไปเมื่อมีการติดเชื้อซ้ำของจุลชีพชนิดเดิม (13)



รูปที่ 13 บทบาทของ CD8+ T cell ต่อ CD4+ T cell ในการยับยั้งเชื้อไวรัสและทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวี CD8+ T cell สร้างสาร Perforin และ Granzyme เพื่อทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ สร้าง Cytokine (IFN gamma, TNF alpha) เพื่อส่งเสริมกลไกการป้องกันไวรัส เช่น การอักเสบ โมเลกุล CAF ยับยั้ง HIV Transcription ในเซลล์ที่ติดเชื้อ และสร้าง Chemokine (MIP-1 beta, MIP-1 alpha) เพื่อขัดขวางการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของเชื้อเอชไอวี (26)

Antigen-Specific CD8+T cell มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส เช่น HIV-1, Cytomegalovirus (CMV) และ Epstein-Barr Virus (EBV) โดยการสร้าง Cytokines, Chemokine และ Cytolytic effector Molecule หน้าที่หลักของ CD8+T cell คือ รับรู้และฆ่าเซลล์ที่ติดเชื้อ (26) ดังรูปที่ 13 CD8+T cell หรือ Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) มีบทบาทในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดย Cytotoxic Pathway ซึ่งมีโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง คือ Perforin และ สารในกลุ่ม Protease Enzyme ได้แก่ Granzyme A และ Granzyme B ทั้ง Perforin และ Granzyme มีบทบาทในการกระตุ้น Apoptotic Cysteine Proteases (Caspases) (24) ดังรูปที่ 14 เราสามารถศึกษาบทบาท และตรวจวัดการตอบสนองของ CD8+T cell โดยใช้เทคนิค Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISpot) assay และ Flow Cytometry ได้ (26)

Perforin เป็นสารในกลุ่ม Cytolytic Protein และ Granzyme ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Serine Proteases ถูกสร้างโดยเซลล์ชนิด CD8+T cell และ NK cell โดยหลั่งออกมาในถุง Cytotoxic granule เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส สามารถตรวจพบ Granzyme ได้ใน Rough endoplasmic reticulum, Golgi complex และ Trans-golgi การออกฤทธิ์ของ Granzyme และ Perforin ต่อเซลล์เป้าหมายเกิดขึ้นโดย Perforin จะรวมตัวกันเป็นโครงสร้างและทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย และส่ง Granzyme เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์เป้าหมายเพื่อกระตุ้น Programed cell death ทำให้เกิด Apoptosis (24) โดย Granzyme B จะกระตุ้น Caspase Dependent Apoptosis Pathway โดยเหนี่ยวนำการทำงานของ Caspase Dependent DNase 40 (CAD/DFF40) และตัวย่อยโมเลกุล Inhibitor CAD/DFF45 (ICAD/DFF45) ซึ่งเป็น inhibitor ของ ICAD/DFF40 และ ICAD/DFF40 จะเข้าสู่นิวเคลียสและเหนี่ยวนำให้เกิด DNA fragmentation ต่อไป ขณะที่ Granzyme A จะกระตุ้น Programed cell death ผ่านทาง Caspase Independent Pathway โดยกระตุ้น Single Strand DNA nicking (81) นอกจากนี้ยังพบว่า Granzyme สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมายโดยการจับกับ Specific Membrane Receptor เช่น Mannose 6-Phosphate Receptor (MPR) (24)



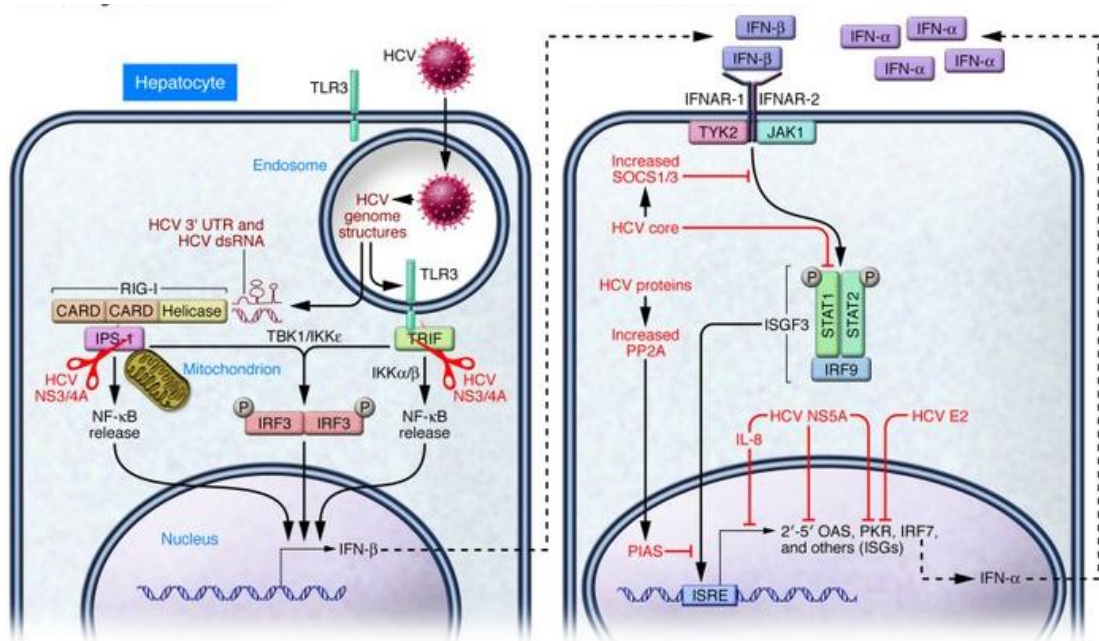
รูปที่ 14 บทบาทของ Granzyme B และ Perforin: A.) Lytic pore ซึ่งเกิดจากการทำงานของ Perforin ส่งผลให้เซลล์เป้าหมายตายเนื่องจากสูญเสียกลไกการควบคุมสมดุลของ Plasma membrane B.) Granzyme B เข้าสู่เซลล์เป้าหมายและเหนี่ยวนำให้เกิด Apoptosis โดย Granzyme B และ Perforin C.) และ D.) แสดงการปล่อยสาร Granzyme B และ Perforin ของ CTL เข้าสู่ Target cell (24)

Interferon gamma (IFN gamma) เป็นสาร Chemokine ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Type II Interferon มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส โดย IFN gamma ถูกพบคุณสมบัติครั้งแรกในการขัดขวางกลไกการเพิ่มจำนวนของไวรัสโรคหัด IFN gamma ช่วยส่งเสริมการต่อต้านไวรัสโดยเหนี่ยวนำการสร้างสาร Proteasome เพิ่มการแสดงออกและเพิ่มความเสถียรของ Major Histocompatibility Complex (MHC) class I เหนี่ยวนำให้เซลล์ติดเชื้อเกิดการ Apoptosis ดังนั้น IFN gamma จึงเป็นโมเลกุลแรกๆ ที่ถูกใช้ในการศึกษาบทบาทหน้าที่และการตอบสนองของ CD8+T cell ต่อการติดเชื้อหรือศึกษาการสร้างภูมิคุ้มกันต่อวัคซีน (26)

CD4+ T cell มีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันและกำจัดเชื้อไวรัสเช่นกัน โดยมีหน้าที่กระตุ้น Macrophages, Dendritic cell และ Antigen Specific B cell สร้าง Cytokines เพื่อกระตุ้น CD8+ T cell (82) Cytokines ที่สร้างจาก CD4+ T cell เช่น IL2 ช่วยกระตุ้น CD8+ T cell ดังนั้น CD4+ T cell จึงมีบทบาทในการรักษาระดับของ CD8+ T cell (83) การศึกษาในหนูทดลองที่ติดเชื้อไวรัสจะสูญเสียการตอบสนอง Virus specific memory T cell เมื่อ CD4+ T cell ถูกทำลาย (84, 85) ดังนั้นการลดลงของ CD4+ T cell ในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd อาจมีผลต่อการดำเนินโรคที่เร็วขึ้น

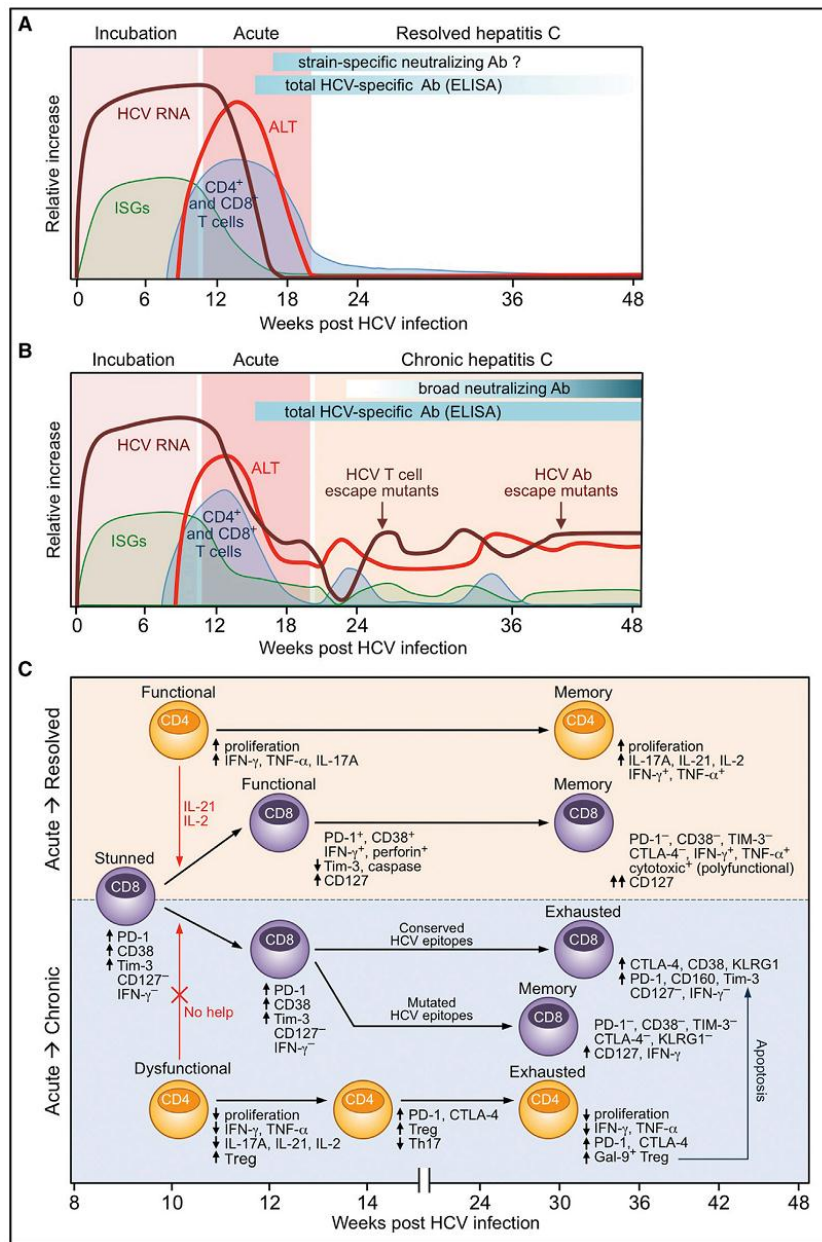
### 3.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีส่วนใหญ่จะถูกวินิจฉัยว่าติดเชื้อหลังจากรับเชื้อมาแล้วประมาณ 10 ปี แม้ว่าจะมีปริมาณไวรัสสูงแต่ปริมาณโปรตีนที่สร้างโดยไวรัสตับอักเสบบีไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้รับรู้ว่ามี การติดเชื้อที่ตับ (86) เมื่อไวรัสตับอักเสบบีเข้าไปสู่เซลล์ตับแล้วจะมีการสร้างโปรตีนทั้งส่วนที่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (C, E1, E2, p7) และไมโซโครงสร้าง (NS2-NS5B) โปรตีนส่วนไมโซโครงสร้างจะมาช่วยในกระบวนการสังเคราะห์สารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอสายบวกจากอาร์เอ็นเอต้นแบบสายลบ (67) ผลจากการสร้างโปรตีนและอาร์เอ็นเอส่งผลกระทบต่อโมเลกุล toll-like receptor 3 (TLR3) และ retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) ส่งผลให้เซลล์ที่ติดเชื้อสร้างสาร IFN- $\beta$  โดยอาร์เอ็นเอกระตุ้นการรับรู้ของ TLR3 และปลาย 3' UTR ของไวรัสจะกระตุ้นการรับรู้ของ RIG-I โมเลกุล TLR3 จะจับกับโมเลกุล Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF) ขณะที่ RIG-I จับกับ IFN- $\beta$  promoter stimulator protein 1 (IPS-1) หรือเรียกว่า CARD adaptor inducing IFN- $\beta$  (CARDIF) ทั้งสองกลไกนี้ทำให้เกิดการสร้าง IFN- $\beta$  ดังรูปที่ 15 อย่างไรก็ตาม กระบวนการสร้าง IFN- $\beta$  นี้ถูกขัดขวางได้ด้วยโปรตีนที่สร้างขึ้นจากไวรัสตับอักเสบบี ได้แก่ HCV core protein, NS5A, E2 ยับยั้งกระบวนการ STAT1 phosphorylation และ STAT1 methylation (64) Nonparenchymal cell จะผลิต IFN type I และ Type III ขณะที่การทดลองการเพาะเลี้ยง Macrophage cell line พบการหลั่ง IFN- $\beta$  หลังจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของเซลล์ตับ และมีการกิน (Phagocyte) อาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีในบริเวณที่มีการอักเสบ Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs) ไม่ได้ตอบสนองโดยตรงต่อไวรัสตับอักเสบบี แต่มีบทบาทคือ กินอาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีผ่าน Exosomes ที่เซลล์ตับขับออกมา ซึ่งกระบวนการนี้เกิดขึ้นโดยตรงโดยเซลล์ต่อเซลล์ (86)



รูปที่ 15 การกระตุ้นการสร้าง IFN- $\beta$  โดยอาร์เอ็นเอของไวรัสตับอักเสบซีกระตุ้นการรับรู้ของ TLR3 และ RIG-I การกระตุ้น JAK/STAT pathway โดย IFN- $\beta$  จับกับ IFN- $\alpha/\beta$  receptor กระตุ้น STAT1-STAT2 heterodimer ขณะที่ HCV core proteins ยับยั้งการกระตุ้น JAK/STAT pathway โดยเหนี่ยวนำ SOCS1/3 มายับยั้ง STAT1 phosphorylation และเหนี่ยวนำ protein phosphatase 2A (PP2A) มารบกวน STAT1 methylation ทำให้รบกวนการจับของ IFN- $\beta$  และ ISG factor 3 (ISGF3) (64)

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในผู้ป่วยแบบเฉียบพลัน หลังการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี 8 สัปดาห์ จะตรวจพบไวรัสปริมาณมากในกระแสเลือด และตรวจพบ Interferon-stimulated gene (ISG) และมีการตอบสนองของ CD4<sup>+</sup> T cells และ CD8<sup>+</sup> T cells ประมาณสัปดาห์ที่ 8-12 และตรวจพบแอนติบอดีหลังจากนั้น ผู้ติดเชื้อที่สามารถกำจัดไวรัสตับอักเสบซีได้พบว่า CD4<sup>+</sup> T cell มีการตอบสนองต่อการติดเชื้อดีมาก มีการเพิ่มจำนวน CD4<sup>+</sup> T cell หลังสาร IL-2, IFN gamma และ TNF- $\alpha$  มากกว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อแบบเรื้อรัง ในกลุ่มผู้ติดเชื้อแบบเรื้อรังพบว่า CD4<sup>+</sup> T cell สูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวน การสร้าง IL-2 และ IFN gamma แต่เพิ่มการแสดงออกของ Inhibitory Receptors T cell Immunoglobulin Domain and Mucin Domain 3 (TIM-3), Programmed Death 1 (PD-1) และ Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) รวมถึงการเพิ่มขึ้นของ Galectin-9 (Gal-9) และ regulatory T cell (Treg) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมปริมาณของ CD4<sup>+</sup> T cell ดังรูปที่ 16 (86)



รูปที่ 16 การเปรียบเทียบการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง A.) การติดเชื้อแบบเฉียบพลัน ในบุคคลที่สามารถกำจัดไวรัสตับอักเสบซีได้ ในระยะฟักตัว 8 สัปดาห์แรก พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณไวรัส และ ISG ประมาณสัปดาห์ที่ 8 จะตรวจพบสาร Aminotransferase (ALT) และพบการตอบสนองของ CD4<sup>+</sup>T cell และ CD8<sup>+</sup> T cell และในสัปดาห์ถัดจากนั้นจะเริ่มตรวจพบแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบซี และปริมาณไวรัสจะลดลงจนตรวจไม่พบ ขณะที่ HCV Specific Memory T cell ยังคงมีอยู่ B.) การติดเชื้อในผู้ป่วยแบบเรื้อรัง หลังจากระยะ Acute phase ปริมาณไวรัสจะลดลงประมาณ 2-3 log<sub>10</sub> ปริมาณไวรัสยังคงอยู่และมีการกลายพันธุ์ในระยะเวลา Chronic phase C.) การตอบสนองของ CD4<sup>+</sup>T cell และ CD8<sup>+</sup>T cell (86)

### 3.3 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd

การติดเชื้อของไวรัสทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันในแง่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะมีการตอบสนองของ Specific CD8+ T cell มากกว่า Specific CD4+ T cell ตรงข้ามกับกลุ่มผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในคนที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้ดีมีการตอบสนองของ Specific CD4+ T cell มากกว่า Specific CD8+ T cell ขณะที่คนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังมีการตอบสนองของ Specific CD4+ T cell ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนที่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้ดี (15) ในทำนองเดียวกันกับรายงานของ Schulze Zur Wiesch และคณะ ที่พบว่าในคนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีครั้งแรกและสามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ พบว่ามีการตอบสนองของ CD4+T cell ขณะที่คนที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังมีการตอบสนองที่ต่ำมาก (87) การหลั่งสาร IFN gamma ของ CD4+ T cell มีบทบาทมากในการต่อต้านเชื้อไวรัส ในสัตว์ทดลองที่ทำการกำจัด CD4+ T cell ออกไปนั้น พบว่าไม่สามารถกำจัดไวรัสได้ (88)

การติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd จะเร่งการดำเนินโรคของโรคตับให้เร็วขึ้น พบว่าการติดเชื้อร่วมกันนี้มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผู้ติดเชื้อชนิดเดียวไม่ว่าจะเป็น HIV monoinfected หรือ HCV monoinfected (12) อัตราการตายของผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีจะเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อร่วมกับเชื้อเอชไอวี ซึ่งสัมพันธ์กับการดำเนินโรคจะพบสูงในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd (89) ก่อนการเริ่มรักษาด้วยยาต้านไวรัสพบว่าผู้ป่วยเอชไอวี มีอัตราการตายด้วยอาการของโรคเอดส์สูงมาก อัตราการตายนี้ลดลงเมื่อมีการเริ่มใช้ยาต้านไวรัส และหลังจากเริ่มมีการใช้ยาต้านไวรัสเอชไอวีกลับพบมีการตายด้วยอาการของโรคตับมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มผู้ติดเชื้อ coinfection โรคตับเป็นสาเหตุการตายเป็นอันดับสองในผู้ป่วยเอดส์และผู้ที่ตายด้วยสาเหตุจากโรคตับนี้ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd (12) ปริมาณ CD4+T cell count ที่ลดลง และ HIV viral load ที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับอัตราการตายที่มีสาเหตุจากโรคตับ (12)

การติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd เชื้อเอชไอวีจะกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน การตอบสนองของ T lymphocyte ที่จำเป็นต่อการต่อสู้ป้องกันไวรัสตับอักเสบบีในระยะเฉียบพลันถึงระยะเรื้อรัง ผู้ป่วยจะสูญเสีย HCV Specific T cell response และมีการดำเนินสู่โรคตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเร็วขึ้น ในผู้ป่วยตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง พบว่าการตอบสนองของ T cell อ่อนแอลงเช่นเดียวกับผู้ป่วยแบบ HIV/HCV coinfectd มีการตอบสนองของ CD4+ และ CD8+ อ่อนแอลงเช่นกัน (12) การวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) ในผู้ป่วยจำนวน 6216 ราย ประกอบด้วยผู้ป่วย HIV/HCV coinfectd และ HIV monoinfected การเพิ่มขึ้นของ CD4+T cell count หลังจากการเริ่มรับยาต้านไวรัสแบบ Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) ผู้ป่วย

HIV/HCV coinfectd มีการเพิ่มขึ้นของ CD4+T cell count น้อยกว่ากลุ่ม HIV monoinfected อยู่ 33 เซลล์ต่อไมโครลิตร (90) การศึกษาของ Yacisin และคณะ พบว่าการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้ป่วยเอดส์ ไม่มีผลกระทบต่อ CD4+ restoration ของคนที่ร่างกายตอบสนองต่อการรับ HAART แต่จะมีผลต่อคนในกลุ่ม IVDU ในช่วงแรกของการรับ HAART (72)

การศึกษาของ Jacqueline และคณะ ที่ศึกษาในอาสาสมัครจำนวน 20 คนที่ติดเชื้อ HIV monoinfected และ 20 คนที่ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd ทั้งหมดเป็นการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (Acute infection) พบว่าการสร้างสาร Interferon gamma (IFN gamma) สัมพันธ์กับปริมาณ CD4+ count ในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd อาจเป็นไปได้ว่า CD4+ T cell อาจสูญเสียคุณสมบัติไป และส่งผลกระทบต่อการกระตุ้นการสร้าง Cytokine ของ memory CD8+ T cell (91) เหมือนกันกับรายงานของ Kim และคณะ ที่พบว่าปริมาณการสร้าง IFN gamma ของ HCV specific CD8+ T cell มีความสัมพันธ์กับปริมาณ absolute CD4+ T cell count กล่าวคือ ในอาสาสมัครที่มีค่า CD4+ T cell count สูงจะพบการสร้าง IFN gamma ในปริมาณสูงด้วย (92) ขณะที่รายงานของ Harcourt และคณะ ไม่พบว่าการสร้าง IFN gamma ของ CD4+ T cell มีความสัมพันธ์กับปริมาณ CD4+ T cell count (93) และการติดเชื้อ HIV นั้น ไม่ได้ทำให้ HCV specific CD8+ T cell ลดลง (92) การเปรียบเทียบการสร้าง Cytokine ( IFN gamma และ IL-2) ของกลุ่มที่มีปริมาณไวรัสเอชไอวีมากกว่า 50 อนุภาคต่อมิลลิลิตร กับอีกกลุ่มที่มีปริมาณไวรัสเอชไอวีน้อยกว่า 50 อนุภาคต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ทั้งสองกลุ่มมีการตอบสนองต่อไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่แตกต่างกัน (91)

การทดลองของ Harcourt และคณะ เปรียบเทียบการสร้าง IFN gamma ของ CD4+ T cell ในกลุ่ม HCV monoinfected กับกลุ่ม HIV/HCV coinfectd ในอาสาสมัครกลุ่มตัวอย่างจำนวน 68 คน และ 67 คนตามลำดับ พบว่าในกลุ่มที่ติดเชื้อ HCV monoinfected มีการสร้าง IFN gamma ที่มากกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในแง่ของจำนวนเซลล์ที่สร้างสเปดและจำนวนอาสาสมัครที่มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ในกลุ่มที่ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd พบว่าสูญเสียกลไกการควบคุมไวรัสตับอักเสบบี โดยภูมิคุ้มกันสูญเสีย HCV specific T cell (93) ในทำนองเดียวกัน การศึกษาการสร้าง IFN gamma ของ Jacqueline K Flynn และคณะ พบความสัมพันธ์เช่นเดียวกัน กล่าวคือ ในอาสาสมัครกลุ่ม HCV monoinfected มี HCV specific IFN gamma responses 12/20 คน ขณะที่กลุ่ม HIV/HCV coinfectd มี 6/20 คน (p=0.055) กล่าวคือ กลุ่ม HCV monoinfected มี HCV specific response ที่มากกว่าทั้งในแง่จำนวน spot ที่มากกว่า และ จำนวน pool peptide ที่ positive มากกว่า (91) และมีรายงานอื่นๆ



ที่ให้ผลในการทำงานเดียวกัน คือ ในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd จะมี HCV specific T cell response ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่ม HCV monoinfected (94, 95)

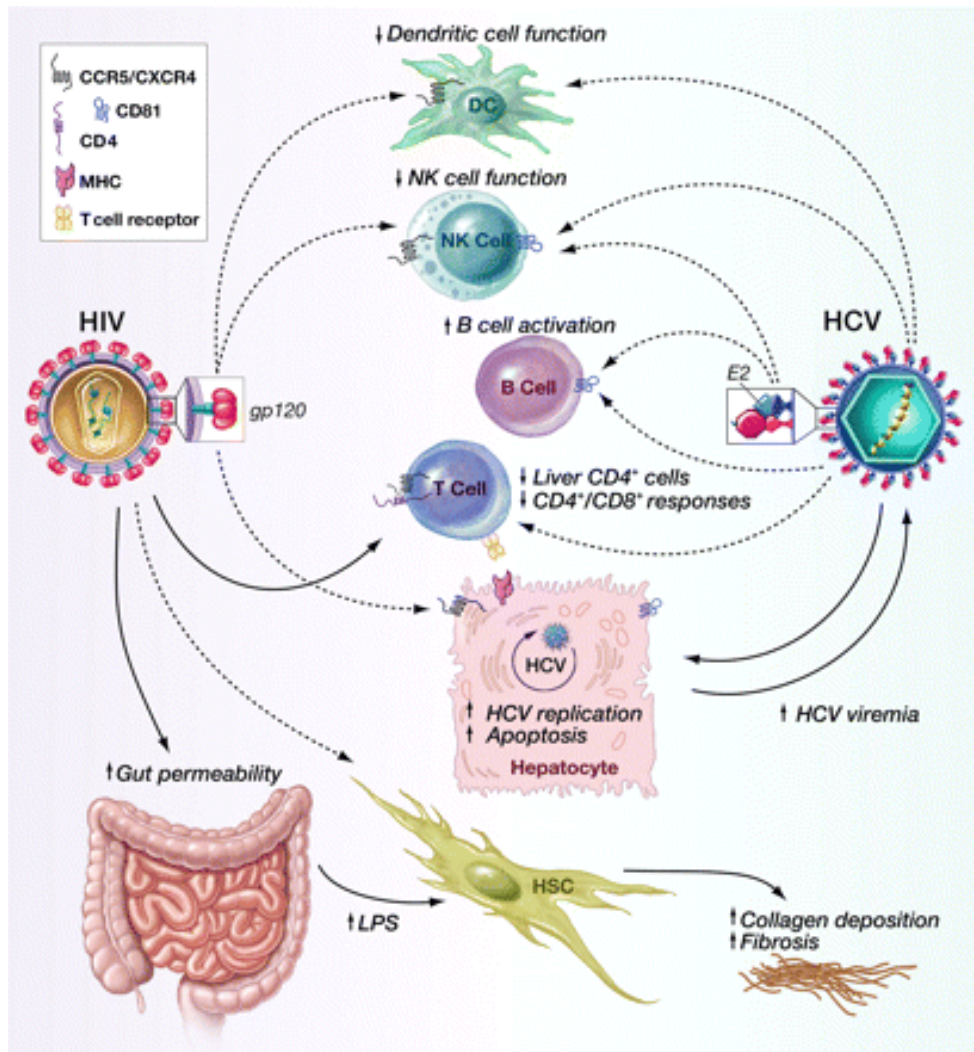
การศึกษาของ Nunez และคณะ ในผู้ติดเชื้อ HIV monoinfected และผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd ที่ไม่เคยได้รับยาต้านเชื้อเอชไอวีพบว่า การ Apoptosis ของ CD4+ T cell, Naïve CD4+ T cell, CD8+ T cell, Naïve และ memory CD8+T cell ในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd มีมากกว่ากลุ่ม HIV monoinfected (96) คล้ายกันกับรายงานของ Korner และคณะ การ Apoptosis พบในอาสาสมัครที่ไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสแบบ HAART กลุ่ม HIV/HCV coinfectd มี Apoptosis มากกว่ากลุ่ม HIV monoinfected และ HCV monoinfected ตามลำดับ และเมื่อรับยาต้านไวรัสแบบ HAART ประมาณ 4 สัปดาห์กลับพบการ Apoptosis ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม HIV/HCV coinfectd และ HIV monoinfected และอาสาสมัครที่รับยาสูตรที่มียาในกลุ่ม protein inhibitor (PI) พบว่ามี apoptosis สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยาสูตร PIs (97) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีการลดลงของจำนวน CD4+T cell เกิดจากการ Apoptosis ซึ่งถูกกระตุ้นโดยเชื้อเอชไอวี (46) การลดลงของ Memory cell อาจเกิดจากการ Apoptosis ซึ่งการทดลองของ Nunez และคณะ แสดงให้เห็นว่า กลุ่ม HIV/HCV coinfectd มีการ Apoptosis ของ naïve CD4+T cell, Naïve CD8+T cell และ memory CD8+T cell มากกว่าคนในกลุ่ม HIV monoinfected ทั้งนี้ การ Apoptosis ที่มากขึ้นนี้อาจเกิดจากผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี (96)

การเปรียบเทียบเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันระหว่างกลุ่มที่ติดเชื้อ HIV monoinfected กับ HIV/HCV coinfectd ในกลุ่มคนที่ไม่รับ HAART พบว่า สัดส่วนของ naïve และ memory ของ CD4+T cell และ CD8+ T cell ไม่แตกต่างกัน ขณะที่สัดส่วนของ Regulatory T cell (Treg) ในอาสาสมัครกลุ่ม HIV monoinfected สูงกว่ากลุ่ม HIV/HCV coinfectd และ CD8+CCR5+ ในกลุ่ม HIV monoinfected น้อยกว่ากลุ่ม HIV/HCV coinfectd (98) ในขณะที่กลุ่มที่รับ HAART สัดส่วนของ activation CD4+T cell และ CD8+T cell ในอาสาสมัครกลุ่ม HIV monoinfected น้อยกว่ากลุ่ม HIV/HCV coinfectd (99)

ความรู้เรื่องเชื้อไวรัสเอชไอวีกับการบุกรุกเซลล์ตับได้โดยตรงยังไม่ชัดเจน เพราะปกติเซลล์ตับมีการแสดงออกของโมเลกุล CCR5 และ CXCR4 ซึ่งเป็น Co-receptor ในการเข้าสู่เซลล์ แต่ไม่พบการแสดงออกของโมเลกุล CD4 บนผิวของเซลล์ตับซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อเอชไอวี มีรายงานว่าเซลล์ตับ Human hepatoma cell line รหัส Huh-7.5 ที่ถูกบุกรุกด้วยไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ JFH-1 และมี CD4+ ที่ผิวเซลล์ พบว่าสามารถถูกบุกรุกด้วยไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ CXCR4

และ CCR5 ได้ (12) การติดเชื้อแบบ coinfection ทำให้ส่วนประกอบของ HIV envelope protein ส่วนที่เป็น gp120 ไปเหนี่ยวนำการเกิด Apoptosis ของตับ โดย CXCR4 G-Protein-Mediated Signaling (100) และสามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกของ Growth factor  $\beta$ 1 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างพังผืด (Profibrotic) (12) ในการศึกษาแบบ in vitro พบว่าโปรตีน HCV E2 ทำหน้าที่ได้เหมือน gp120 คือ กระตุ้นการเกิด Apoptosis โดยกระตุ้นผ่าน STAT1 Phosphorylation และกระตุ้นการแสดงออกของ Fas ligand ใน CXCR4-manner (101, 102) การบุกรุกของไวรัสตับอักเสบซีทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ของ B cell แบบ Polyclonal Proliferation ทำให้เกิดแอนติบอดีต่อตัวเอง และเป็นสาเหตุให้เกิดโรค HCV-Associated Autoimmune Disorder, Mixed Cryoglobulinemia และโรค non-Hodgkin's Lymphoma (103) ขณะเดียวกันยังมีรายงานผลจากการบุกรุกของไวรัสตับอักเสบซีทำให้เกิดความผิดปกติของ Dendritic cell (12) และยังเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของ NK cell โดยปฏิกิริยาของโปรตีน HCV E2 กับ CD81 (104) ดังรูปที่ 17





รูปที่ 17 กลไกการบุกรุกของเชื้อเอชไอวีและเชื้อไวรัสตับอักเสบซี เชื้อเอชไอวีจะไม่บุกรุกเซลล์ตับ แต่การติดเชื้อเอชไอวีจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของไวรัสตับอักเสบซี ซึ่งการบุกรุกของเชื้อเอชไอวีที่ CD4+T cell ส่งผลกระทบโดยโปรตีน gp120 จะมีปฏิสัมพันธ์กับ Chemokine receptor ที่ตับและเซลล์อื่นๆ ของระบบภูมิคุ้มกันที่ตับ การติดเชื้อเอชไอวีที่ Gut-associated Lymphoid Tissue ส่งผลให้มีการใช้ LPS มากขึ้นเกิดการกระตุ้น Hepatic Stellate Cell (HSC) และเพิ่มการเกิดพังผืดที่ตับ ผลของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจะส่งผลกระทบหลังจากเกิดผลกระทบจากการติดเอชไอวี ในภาพลูกศรจุดไข่ปลาคือผลกระทบของ viral envelope และลูกศรเส้นทึบแสดงการบุกรุกของไวรัส (12)

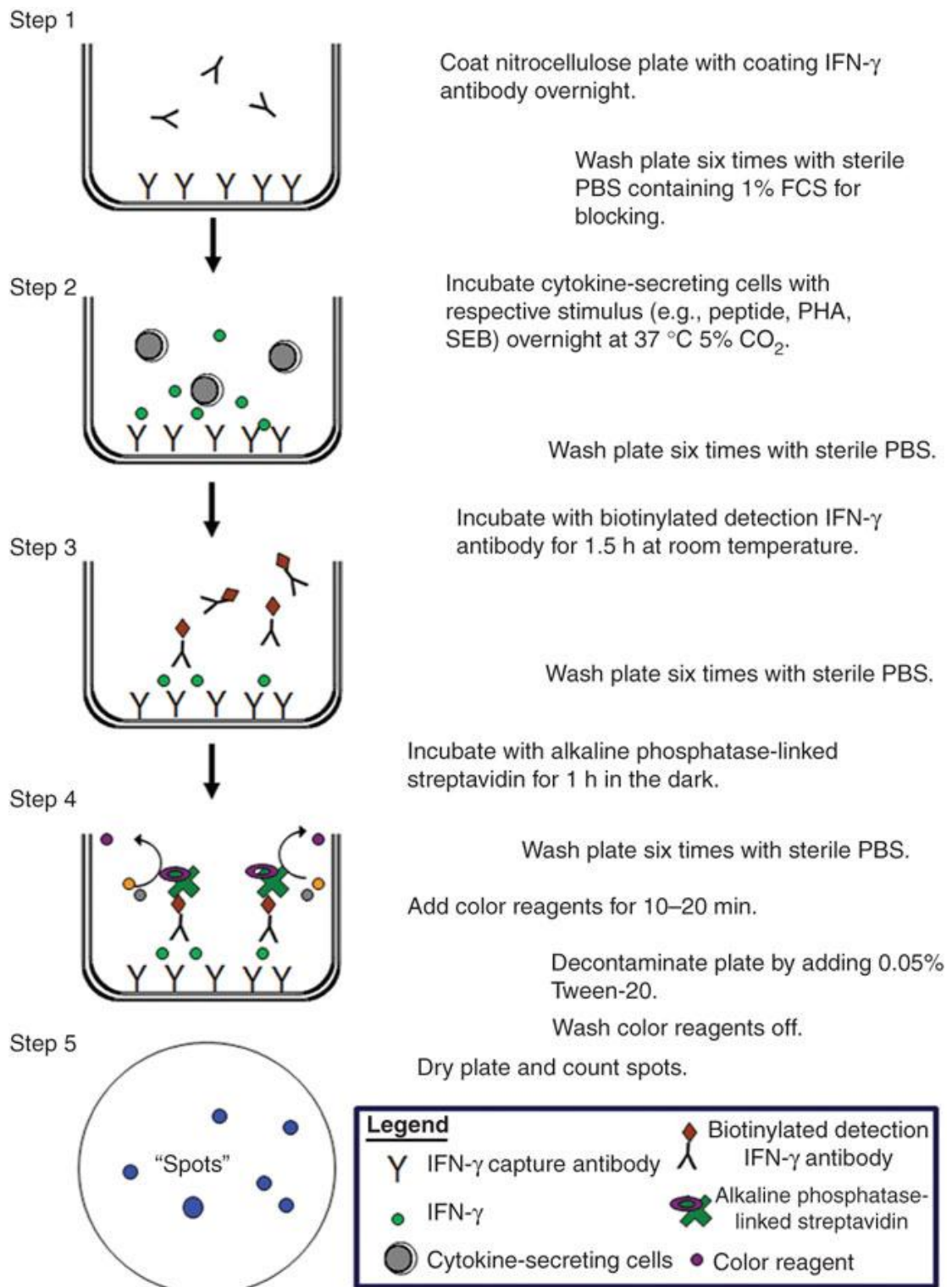
#### 4. เทคนิคการตรวจวัดการตอบสนองของ T cell

##### 4.1. วิธี Enzyme-linked Immunospot (ELISpot) assay

วิธี ELISpot assay ใช้หลักการเดียวกันกับวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ชนิด double sandwich ที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน แต่มีข้อแตกต่างคือ แอนติเจน ที่ต้องการตรวจหาไม่ได้อยู่ในสารคัดหลั่งหรือซีรัม แต่เป็นแอนติเจน ที่ผลิตและหลั่งจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้ตอบสนอง เช่น IFN gamma ซึ่งเป็น Cytokine ชนิดหนึ่งที่หลั่งจาก CTL ที่นำเสนอ peptide จำเพาะของเชื้อเอชไอวี นอกจากนี้ยังสามารถตรวจหา แอนติเจน อื่นๆ ได้อีก เช่น interleukine, granzyme และ tumor necrosis factor เป็นต้น (13)

หลักการ คือ เคลือบหลุม plate ด้วยแอนติบอดีตัวที่ 1 ที่กั้นหลุม ซึ่งจะมีเมมเบรนชนิด nitrocellulose รองที่กั้นหลุม จากนั้นเติมตัวอย่าง Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ลงไปพร้อมกับแอนติเจนที่ต้องการทดสอบ ในหลุม Positive control แอนติเจนที่ใส่และสามารถกระตุ้นเซลล์ได้ดี เช่น Phytohemagglutinin PHA-P (PHA) หลุม Negative control ใส่ media แทนแอนติเจน ถ้าเซลล์มีการหลั่ง Cytokine ที่ต้องการทดสอบออกมา Cytokine จะจับกับแอนติบอดีตัวที่ 1 ที่เคลือบอยู่ที่กั้นหลุม หลังจากนั้นทำการล้าง และเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 ลงไป ซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ แอนติบอดีตัวนี้จะจับกับ Cytokine ที่ถูกจับด้วยแอนติบอดีตัวที่ 1 ไว้ก่อนแล้ว ในลักษณะเป็นแซนวิช และเมื่อเติม substrate จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่ติดฉลากไว้ จะปรากฏจุดสี (spot) เกิดขึ้น แต่ละจุดคือตำแหน่งของเซลล์ที่หลั่ง Cytokine ออกมา และใช้หน่วยเป็น spot forming count (sfc) การนับจำนวนจุดสีทำได้หลายแบบ เช่น การนับด้วยตาเปล่าผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยนับจำนวนจุดสีต่อหลุม แต่เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลานานและอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ แต่ในปัจจุบันมีเครื่องนับและวิเคราะห์อัตโนมัติที่เรียกว่า Immuno Spot Analyzer ซึ่งจะทำให้การอ่านผลสะดวกและมีความแม่นยำมากขึ้น (13)

ในปัจจุบันได้นำวิธีนี้มาตรวจวิเคราะห์อย่างแพร่หลาย เช่น ตรวจวิเคราะห์การตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของอาสาสมัครที่ได้รับวัคซีนเอดส์เนื่องจากวิธีนี้มีความไวสูง พบว่าสามารถตรวจพบ Cytokine จำนวน 100 โมเลกุลได้ เนื่องจาก Cytokine ดังกล่าวถูกปล่อยออกมา ในขณะที่เซลล์ถูกกระตุ้น ดังนั้นความเข้มข้นของ cytokine รอบเซลล์จึงสูงมาก และจะถูกจับด้วย anti-IFN-gamma-antibody ที่ถูกเคลือบไว้ที่กั้นหลุมทันที วิธีนี้ยังเหมาะสำหรับการตรวจหา CTL epitope ของเชื้อเอชไอวี ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการสร้างวัคซีน อย่างไรก็ตามวิธีนี้เหมาะสำหรับใช้วัดการตอบสนองเฉพาะ effector cell ที่อยู่ในตัวอย่างตรวจขณะนั้น แต่ถ้าต้องการทดสอบ Memory cell หรือ PBMCs จะต้องผ่านกระบวนการกระตุ้นทางหลอดทดลอง (In vitro) เสียก่อน นอกจากนี้จำนวนเซลล์ที่ตอบสนองอาจน้อยกว่าความเป็นจริง เนื่องจากไม่มีการหลั่ง Cytokine หรืออาจหลั่ง Cytokine ชนิดอื่นแทน (13)



รูปที่ 18 ขั้นตอนการทำ ELISpot Assay ขั้นตอนที่ 1 เคลือบหลุมเพลตด้วยแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง ขั้นตอนที่ 2 ป้อนเซลล์พร้อมกับแอนติเจนที่ใช้ทดสอบ ขั้นตอนที่ 3 เติมแอนติบอดีตัวที่ 2 ขั้นตอนที่ 4 เติมเอ็นไซม์และสี ขั้นตอนที่ 5 นับจำนวน spot (105)

## 4.2 วิธี Intracellular cytokine staining (ICS) assay

เนื่องจากวิธี ELISpot สามารถทดสอบหาเซลล์ที่หลั่ง Cytokine ได้เพียงคร่าวๆ เท่านั้น จึงมีการพัฒนาวิธีที่หาเซลล์ที่หลั่ง Cytokine เป็นจำนวนตัวเลขได้ ซึ่งเป็นการตรวจวัด cytokine ตั้งแต่อยู่ในเซลล์ หรือที่เรียกว่า Intracellular Cytokine Staining (ICS) assay โดยการใช้เครื่อง Flow cytometer หลักการของวิธี คือ Cytokine ที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์หลังจากถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนจำเพาะ จะถูกขัดขวางไม่ให้ขนส่งผ่าน Golgi complex ไปยังภายนอกเซลล์โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติห้ามการส่งโปรตีนออกนอกเซลล์ เช่น Brefeldin A ทำให้ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์มีการสะสมของ Cytokine ชนิดต่างๆ ที่ถูกสร้างขึ้น หลังจากนั้นนำเซลล์ไปผ่านกระบวนการ fixation, permeabilisation และการย้อมด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ Cytokine ชนิดต่างๆ ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสงหลายชนิด จะทำให้สามารถตรวจพบเซลล์ที่มี Cytokine สะสมอยู่ภายในเซลล์ โดยใช้เครื่อง Flow cytometer วิธีนี้สามารถบอกจำนวนเซลล์ ชนิดของเซลล์ที่สร้าง Cytokine รวมทั้งชนิดและจำนวนของ Cytokine ที่เซลล์แต่ละเซลล์สร้างขึ้น เช่น การวัด Cytokine ที่สร้างขึ้นภายใน T cell ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี เป็นต้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ต้องใช้จำนวนเซลล์มากกว่าวิธี ELISpot แต่เป็นวิธีเดียวที่สามารถตรวจสอบการสร้าง Cytokine ได้หลายชนิดจากเซลล์เดียวกันและทราบถึงคุณลักษณะของเซลล์นั้นๆ ด้วย นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่สามารถทดสอบ T cell ของผู้ติดเชื้อจำนวนมากพร้อมๆ กัน โดยใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่าวิธีอื่นๆ (13)

### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1. อุปกรณ์และสารเคมี

- 1.1 Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS), catalog No. 14190-144; RPMI medium 1640 (1X), catalog No. 21870-076; Fetal Bovine Serum Heat inactivated (FBS), catalog No. 16140-063; L-Glutamin (200 mM), catalog No. 25030-081; Penicilin/Streptomycin (10000 U/ml), catalog No. 15140-122; Trypan Blue Stain 0.4%, Catalog No. 15250 บริษัท Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.2 Phosphate Buffer Saline (PBS) 10X, Catalog No. BP665-1 บริษัท Fisher Bioreagents® ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.3 Human Serum AB (HAB), catalog No. 100-512 บริษัท Gemini Bio-Products ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.4 Histopaque® -1077 (Ficol), catalog No. RNBC4850; Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybri-Max®, catalog No. D2650; Phytohemagglutinin PHA-P (PHA), catalog No. L9132; Albumin bovine (BSA), catalog No. A9418-100G บริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.5 Anti-Human Interferon gamma mAb 1-D1K: Code 3420-3-1000; Anti-Human Interferon gamma mAb 7-B6-1-Biotin: Code 3420-6-1000 บริษัท Mabtech ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
- 1.6 Tween® 20, Catalog No. H5152 บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.7 Vectastain® ABC kit, catalog No. PK-6100; Peroxidase Substrate AEC kit, catalog No. SK-4200 บริษัท Vector ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
- 1.8 HCV One Step Hepatitis C Virus Test Strip, Catalog No. IHC-301 บริษัท ABON ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
- 1.9 FACS™ Permeabilizing Solution 2 (10X), Catalog No. 340973; BD FACS™ Lysing Solution (10X), Catalog No. 349202; PE mouse Anti-Human Granzyme A set, Catalog No. 558904; PE mouse Anti-Human Granzyme B, Catalog No. 561142; PE Perforin reagent set, Catalog No. 4156670; FITC mouse Anti-Human CD3, Catalog No. 555339; PerCP mouse Anti-Human CD8, Catalog No. 347314 บริษัท BD Biosciences ประเทศราชอาณาจักรเบลเยียม
- 1.10 50 ml Leucosep™ tube, Catalog No. 227290 บริษัท Greiner Bio One International GmbH ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 1.11 MultiScreen® -IP Sterile White 96-Well Plate, catalog No. S2EM004M99 บริษัท Millipore ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี

## 2. เครื่องมือ

- 2.1 เครื่อง Flow cytometry รุ่น FACs caliber, บริษัท *Becton Dickinson* ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
- 2.2 เครื่อง Immunospot Capture รุ่น C.T.L. ImmunSpot capture 5.0 และโปรแกรม ImmunSpot 5.0 Professional DC ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี
- 2.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง Centifuge IEC Centra GP8R, บริษัท Thermo Electron Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 2.4 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิและความชื้น Steri-Cult CO<sub>2</sub> Incubator, บริษัท Thermo Electron Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา





### 3. วิธีการทดลอง

#### 3.1 อาสาสมัครในการทดลองและการเก็บตัวอย่าง

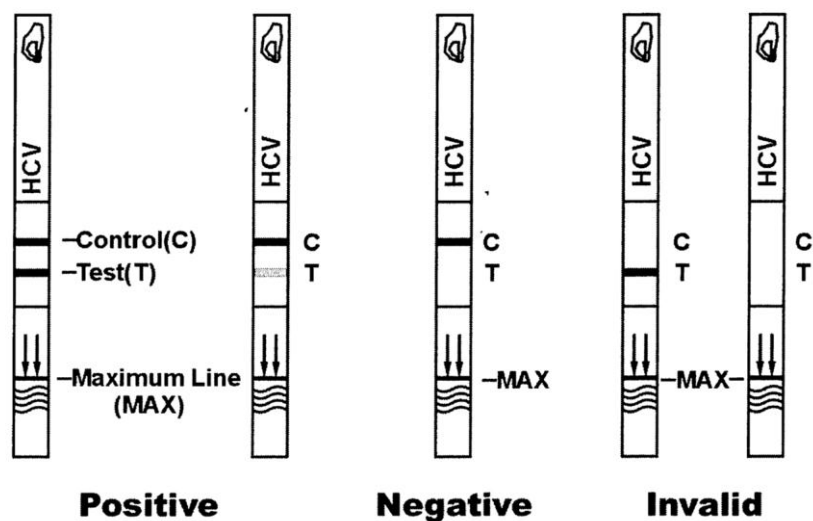
ตัวอย่างในงานวิจัยได้รับการอนุเคราะห์จากเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์ สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการเก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร โดยอาสาสมัครที่มีนัดเข้ารับการตรวจติดตามผลที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และมีการเก็บตัวอย่างเลือดด้วยหลอดชนิด EDTA สำหรับตรวจหาค่า CD4 count โดยส่งตรวจที่หน่วยปฏิบัติการบริการวิทยาศาสตร์ และได้รับความอนุเคราะห์ผลการตรวจค่า CD4 count เพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ผลการทดลอง ตัวอย่างเลือดสำหรับงานวิจัยใช้หลอดเก็บตัวอย่างที่มีสารกันการแข็งตัวของเลือดชนิด Acid Citrate Dextrose tube (ACD) ขนาด 8 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด แยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) จากตัวอย่างเลือดดังกล่าวเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

อาสาสมัครที่เชิญเข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้มีคุณสมบัติดังนี้ 1.) เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี 2.) ผลการทดสอบแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบบีเป็นลบ (สำหรับกลุ่มที่ 1 และ 2) หรือ ผลบวก (กลุ่มที่ 3) 3.) มีสุขภาพแข็งแรงสามารถบริจาคเลือดได้ 4.) รับประทานไวรัส 5.) เข้ารับการตรวจติดตามผลที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 6.) มีความยินดีเข้าร่วมงานวิจัย

การทดลองนี้ได้รับการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขไออาร์บี 613/57 (ตุลาคมพ.นวก) อาสาสมัครได้รับทราบข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยและยินดีเข้าร่วมงานวิจัยในครั้งนี้

#### 3.2 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

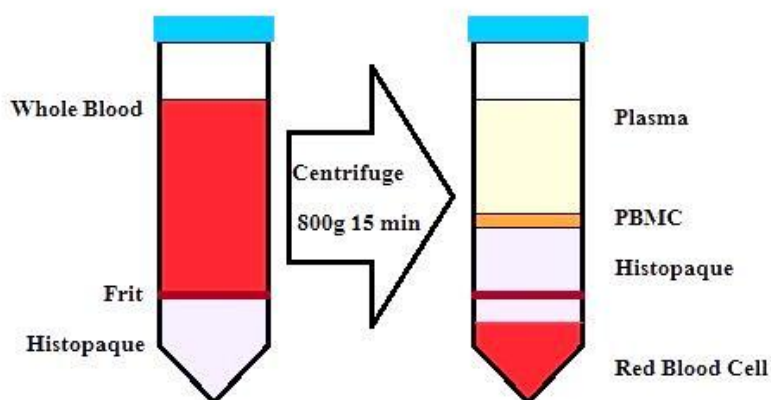
ตรวจคัดกรองอาสาสมัครด้วยชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วยชุดตรวจเบื้องต้น “HCV One Step Hepatitis C Virus Test Strip” (ABON สาธารณรัฐประชาชนจีน) โดยแบ่งตัวอย่างเลือดจากหลอดเก็บตัวอย่างเลือดชนิด EDTA จำนวน 0.6 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และปั่นที่ความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บซีรัมจากส่วนใสใสหลอด microcentrifuge เพื่อใช้ทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยจุ่มแผ่นทดสอบลงในซีรัมที่ระดับความลึกไม่เกิน “maximum line” เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นวางแผ่นทดสอบบนพื้นผิวที่ไม่ดูดซึม และอ่านผลภายในเวลา 10-20 นาที ผลจากการทดสอบมีดังนี้ 1.) ผลบวก คือ มีขีดขึ้น 2 ขีดที่แถบควบคุม (C) และแถบทดสอบ (T) 2.) ผลลบคือ มีขีดขึ้นที่แถบควบคุมแต่ไม่มีขีดขึ้นที่แถบทดสอบ 3.) แผลผลไม่ได้ คือ ไม่มีขีดขึ้นที่แถบควบคุมและแถบทดสอบ หรือมีขีดขึ้นที่แถบทดสอบอย่างเดียว ดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 ชุดทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและการอ่านผล ในรูปแสดงstripsที่ให้ผลบวก ผลลบ และ แปลผลไม่ได้

### 3.3 การแยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

การแยกตัวอย่างเลือดโดยใช้สาร Histopaque-1077 (Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา) และหลอด Leucosep™ (Greiner Bio One International GmbH ประเทศสหรัฐอเมริกา) ใส่ Histopaque-1077 จำนวน 15 มิลลิลิตร ลงในหลอด Leucosep™ ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นตกที่ 800g เป็นเวลา 1 นาที ก่อนใส่ตัวอย่างเลือด 20-30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ 800g เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจะได้ตัวอย่างที่แยกชั้นระหว่าง PBMCs และ เม็ดเลือดแดง โดยเรียงลำดับชั้นที่แยกได้จากบนลงล่างดังนี้ ชั้นของพลาสมา ชั้นของ PBMCs ชั้นของ Histopaque-1077 และชั้นล่างสุดคือ เม็ดเลือดแดง ดังรูปที่ 20 ใช้ปิเปตดูดเอาเซลล์ในชั้น PBMCs มาให้หมดและใส่ลงใน Wash media (RPMI 1640 จำนวน 97% FBS จำนวน 2% และ Penicillin/Streptomycin จำนวน 1%) จำนวน 40 มิลลิลิตร ปั่นล้างสองครั้งที่ความเร็ว 300g เป็นเวลา 10 นาที ที่มีส่วนใสและเติม Wash media 10 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันดี และตรวจนับเซลล์ด้วย Haemocytometer ใช้สี Trypan Blue ความเข้มข้น 0.4% ย้อมเซลล์เพื่อใช้แยกเซลล์เป็นและเซลล์ตาย ปั่นล้างเซลล์ที่ 300g เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง เพื่อแบ่งเซลล์เก็บรักษาใน Freezing media (RPMI 1640 จำนวน 69% FBS จำนวน 20% DMSO จำนวน 10% และ Penicillin/Streptomycin จำนวน 1%) ความเข้มข้นของเซลล์ 5 ล้านเซลล์ต่อ Freezing media จำนวน 1 มิลลิลิตร ต่อหลอด เก็บหลอดเซลล์ใน Cryocone และแช่เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืนก่อนย้ายไปเก็บไว้ที่ตู้ -135 องศาเซลเซียส หรือเก็บในถังเก็บแบบไนโตรเจนเหลวในวันรุ่งขึ้น

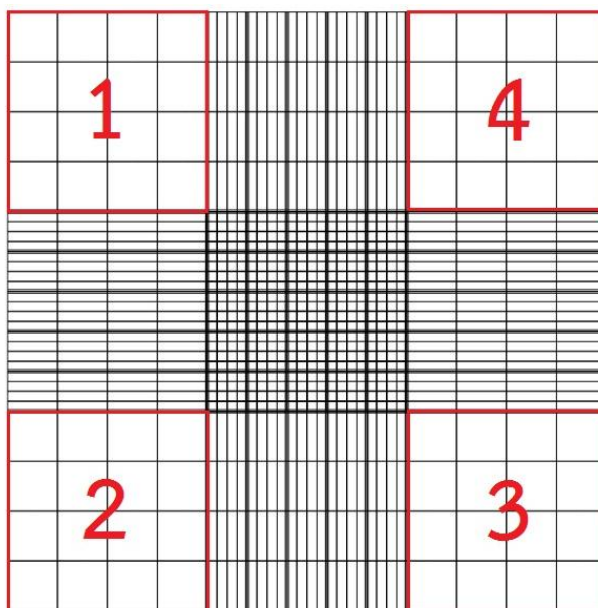


รูปที่ 20 แสดงการแยก PBMCs ด้วยสาร Histopaque-1077 โดยใช้ Accuspin tube

### 3.4 การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer

การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer ทำได้ดังนี้ ดูด PBMCs ที่ผสมจนเข้ากันดีแล้วกับ Wash media จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับสี Trypan Blue ความเข้มข้น 0.4% จำนวน 90 ไมโครลิตร (จะได้ค่าการเจือจางเท่ากับ 10) หรือผสมกับสี Trypan Blue 40 ไมโครลิตร (จะได้ค่าการเจือจางเท่ากับ 5) ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดใส่ใน Haemocytometer จำนวน 10 ไมโครลิตร ตรวจนับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มีชีวิตคือเซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำเงิน และเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินคือเซลล์ที่ตายแล้ว นับเซลล์จำนวนอย่างน้อย 4 ช่องและคำนวณหาจำนวนเซลล์ของ PBMCs จากค่าที่นับได้ (106) ดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมด} = \frac{\text{จำนวนเซลล์มีชีวิตที่นับได้}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 10^4 \times \text{ปริมาตร}$$



รูปที่ 21 จำนวนช่องของ Haemacytometer ช่องที่ใช้นับเซลล์คือช่องที่ 1-4 (106)

### 3.5 การเตรียม PBMCs เพื่อใช้ในการทดลอง

ละลาย PBMCs ที่ถูกแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -135 องศาเซลเซียส ด้วยการแกว่งหลอดเซลล์ใน น้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์แช่แข็งเริ่มละลายจนเห็นเกล็ดน้ำแข็งเล็กน้อย แล้วย้าย สารละลายเซลล์ใส่ใน Wash media 40 มิลลิลิตร และปั่นล้างด้วยความเร็ว 450g เป็นเวลา 10 นาที และเทของเหลวส่วนใสทิ้ง ล้างอีกครั้งด้วย Wash media 30 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ Complete Media (RPMI 1640 จำนวน 87% HAB จำนวน 10% L-Glutamine จำนวน 2% และ Penicillin/Streptomycin จำนวน 1%) สำหรับเซลล์ที่ใช้ทำ ELISpot Assay หรือ 10% FBS Media (RPMI 1640 จำนวน 87% FBS จำนวน 10% L-Glutamine จำนวน 2% และ Penicillin/Streptomycin จำนวน 1%) สำหรับเซลล์ที่ใช้ทำ Flow cytometry จำนวน 5 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer และปั่นด้วยความเร็ว 450g เป็นเวลา 10 นาที ปรับ ปริมาตรเซลล์ด้วย Complete Media หรือ 10% FBS Media ให้ได้ความเข้มข้น  $2 \times 10^6$  เซลล์ต่อ มิลลิลิตร คลายเกล็ดวฝาลอดทดลองหนึ่งรอบแล้วบ่มข้ามคืนในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ความชื้นสัมพัทธ์ 90%

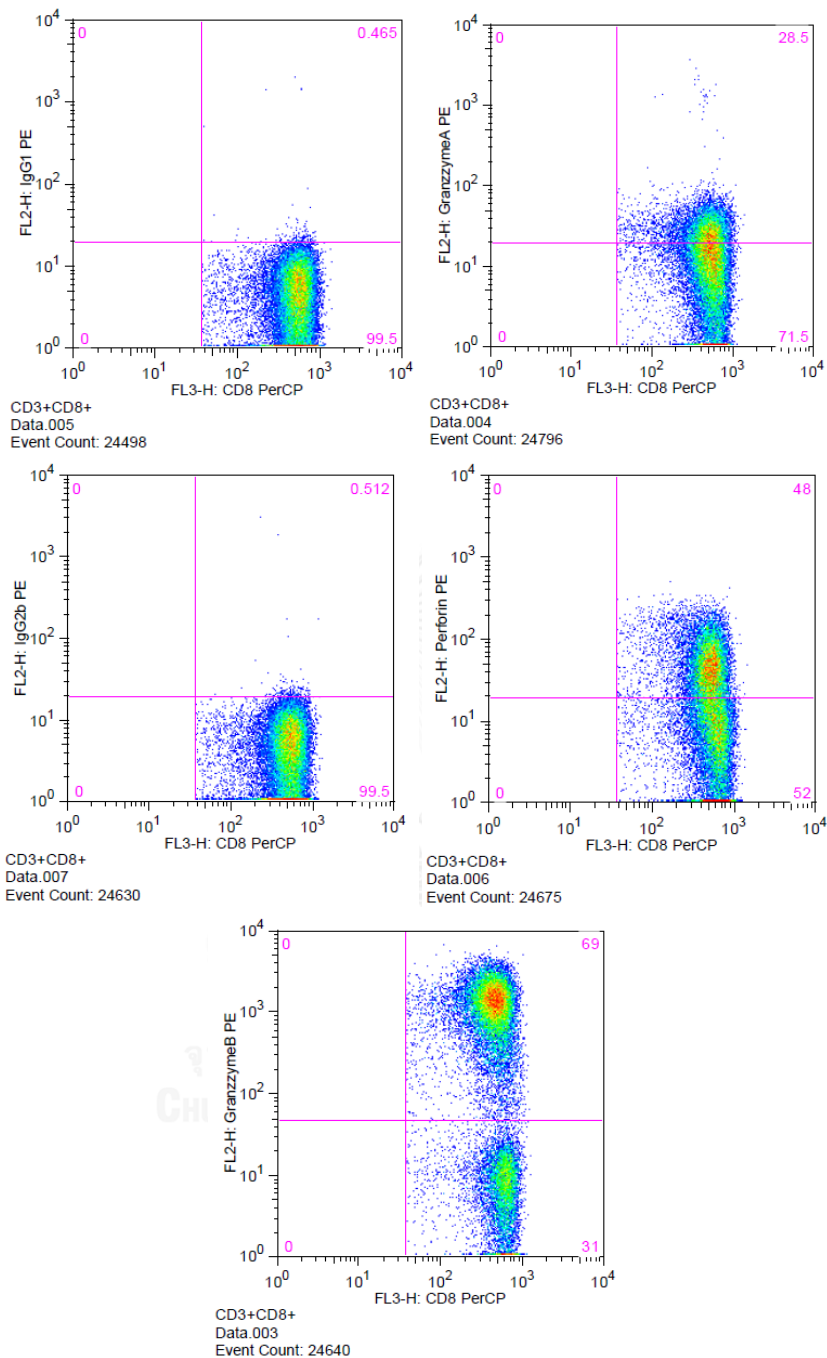
### 3.6 Flow cytometry

การย้อม PBMCs นี้ดัดแปลงวิธีมาจาก Nattawat และคณะ (25) หลังจากบ่ม PBMCs ข้ามคืนแล้ว นับจำนวนเซลล์มีชีวิตด้วย Haemacytometer แบ่ง PBMCs จำนวน 0.5 ล้านเซลล์ใส่ หลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 7 หลอด เติม DPBS (Gibco ประเทศสหรัฐอเมริกา) จำนวน

2 มิลลิลิตร ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 450g เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง เติมด้วย FITC mouse Anti-Human CD3 จำนวน 20 ไมโครลิตร และ PerCP mouse Anti-Human CD8 จำนวน 20 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่ 2-7 หลอดทดลองที่ 1 เติม DPBS จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้น ใส่ FACS lysing solution (เจือจาง BD FACS™ FACS Lysing Solution ความเข้มข้น 10 เท่า จำนวน 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 9 มิลลิลิตร) จำนวน 1 มิลลิลิตร และบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 450g เป็นเวลา 5 นาที และเทของเหลวส่วนใสทิ้ง เติม Wash buffer (DPBS จำนวน 98% และ FBS จำนวน 2%) จำนวน 2 มิลลิลิตร ปั่นตกที่ความเร็ว 450g เป็นเวลา 5 นาที และเทของเหลวส่วนใสทิ้ง เติม Perm 2 solution (เจือจาง FACS™ Permeabilizing Solution 2 ความเข้มข้น 10 เท่าจำนวน 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 9 มิลลิลิตร) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเติม Wash buffer จำนวน 2 มิลลิลิตร และปั่นตกที่ความเร็ว 800g เป็นเวลา 5 นาที และเทของเหลวส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม PE mouse Anti-Human Granzyme A, PE mouse Anti-Human Granzyme B, PE mouse Anti-Human Perforin, PE mouse IgG1 และ PE mouse IgG2b (Reagent ทั้งหมดจาก BD Biosciences ประเทศสหรัฐอเมริกา) อย่างละ 20 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดของหลอดที่ 3-5 ตามลำดับ หลอดที่ 1-2 เติม Wash buffer จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ล้างด้วย Wash buffer จำนวน 2 มิลลิลิตร และปั่นที่ความเร็ว 800g เป็นเวลา 5 นาที และเทของเหลวส่วนใสทิ้ง ล้างอีก 2 ครั้งก่อนจะตรึงเซลล์ด้วย 1% Paraformaldehyde จำนวน 250 ไมโครลิตร เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง FACs Calibur

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACs Calibur โดยใช้โปรแกรม CellQuest เลือกเขียนกราฟระหว่างค่า Forward Scatter-Hight (FSC-H) และ Side Scatter-Hight (SSC-H) เป็นแกน X และแกน Y ตามลำดับ เลือกกลุ่มตัวอย่าง Lymphocyte เพื่อเปรียบเทียบค่า FL1-H: CD3 FITC และ FL3-H: CD8 PerCP เป็นแกน X และแกน Y ตามลำดับ เลือกกลุ่มประชากรที่ให้ผลบวกทั้ง FL1-H และ FL3-H (ดังรูปที่ 24) เขียนกราฟเปรียบเทียบค่าระหว่าง FL3-H: CD8 PerCP และ FL2-H: PE เป็นแกน X และแกน Y ตามลำดับ แบ่งกราฟออกเป็น 4 แขน นำจำนวนประชากรของเซลล์ที่ได้ในช่องขวาบนและขวาล่างมาเปรียบเทียบกัน โดยคิดเป็นสัดส่วนร้อยละ

การแบ่งแกนของ Granzyme A PE ต้องเท่ากับ IgG1 PE โดยการแบ่งแกนของกราฟ FL3-H: CD8 PerCP และ FL2-H: IgG1 PE ก่อนและคัดลอกแกนจากกราฟดังกล่าวมาวางในกราฟของ FL3-H: CD8 PerCP และ FL2-H: Granzyme A PE การแบ่งแกนของ Perforin PE ต้องเท่ากับ IgG2b PE โดยการแบ่งแกนของกราฟ FL3-H: CD8 PerCP และ FL2-H: IgG2b PE ก่อนและคัดลอกแกนจากกราฟดังกล่าวมาวางในกราฟของ FL3-H: CD8 PerCP และ FL2-H: Perforin PE ในส่วนของ Granzyme B ประชากรเซลล์กลุ่มบวกและลบแบ่งกันชัดเจน สามารถแบ่งแกนได้ตามลักษณะของกราฟของแต่ละตัวอย่าง ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 การแบ่งแแกนเพื่อแบ่งประชากรของเซลล์ระหว่างกลุ่มที่มีผลบวกและลบของ FL2-H: PE ในแต่ละกราฟถูกแบ่งเป็นสี่ช่อง ช่องบนขวาคือกลุ่มประชากรเซลล์ที่ให้ผลบวก PE และ CD8 PerCP ช่องล่างขวาคือกลุ่มประชากรที่ให้ผลลบ PE และ ผลลบ CD8 PerCP แแกนทางซ้ายคือประชากรเซลล์ที่ให้ผลลบ CD8 PerCP ซึ่งเลือกให้กราฟไม่แสดงค่าเนื่องจากต้องการเปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มประชากร CD3+CD8+ ตัวเลขที่แสดงคือร้อยละของประชากรในแต่ละช่อง

### 3. Specific IFN gamma interferon ELISpot Assay

การตรวจวัดการหลั่งสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมาด้วยเทคนิค ELISpot Assay (Specific IFN gamma interferon ELISpot Assay) มี HIV-1 Gag pool Peptide และ HIV-1 ENV pool Peptide เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารอินเตอร์เฟอรอนแกมมา ขั้นตอนการทำมีดังนี้ (93)

การเตรียมเพลต MultiScreen<sup>®</sup>-IP Sterile White 96-Well Plate (Millipore ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ชนิดเมมเบรน Polyvinylidene fluoride (PVDF) ใส่ 70% แอลกอฮอล์ 15 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 วินาที และล้างด้วย DPBS 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง และเติมสารละลาย Anti-Human Interferon gamma mAb 1-D1K (Mabtech ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ซึ่งละลายด้วย DPBS ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส หนึ่งคืน ล้างเพลตด้วย DPBS 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง เติม Complete Media จำนวน 150 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การเตรียม PBMCs เตรียมตั้งขั้นตอนที่กล่าวไว้ข้างต้นแล้วในข้อ 3.5 หลังจาก PBMCs ถูกบ่มไว้ค้างคืนแล้วจึงนำมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย Heamacytometer และปรับปริมาตร PBMCs ด้วย Complete Media ให้ได้ความเข้มข้น  $4 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมเซลล์ลงในเพลต 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม จำนวนเซลล์ต่อหลุมคือ  $0.2 \times 10^6$  เซลล์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 1
B	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 2
C	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 3
D	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 4
E	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 5
F	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 6
G	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 7
H	Media+Cell	Media+Cell	Media+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Gag+Cell	Env+Cell	Env+Cell	Env+Cell	PHA+cell	PHA+cell	PHA+cell	Sample 8

รูปที่ 23 แผนผังแสดงการใส่สารกระตุ้น และ PBMCs หลุมที่ 1-3 คือ Negative control ใส่ Complete Media และ PBMCs อย่างละ 50 ไมโครลิตร หลุมที่ 4-6 คือ HIV-1 Gag pool peptide และ PBMCs อย่างละ 50 ไมโครลิตร หลุมที่ 7-9 คือ HIV-1 Env pool peptide และ PBMCs อย่างละ 50 ไมโครลิตร และหลุมที่ 10-12 คือ Positive control ใส่ PHA และ PBMCs อย่างละ 50 ไมโครลิตร

การเตรียมสารกระตุ้น สารที่ใช้กระตุ้นเซลล์ได้แก่ Phytohemagglutinin PHA-P (PHA) เป็น Positive control จากความเข้มข้นสารตั้งต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ละลายด้วย Complete Media ให้ได้ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุม 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) HIV-1 Gag pool peptide และ HIV-1 Env pool Peptide ละลายสารตั้งต้นด้วย

Complete Media ให้ได้ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Negative control ใช้ Complete Media ใส่สารกระตุ้นลงในหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตร ดังรูปที่ 23

เมื่อบล็อกเพลตเสร็จแล้ว คว่ำเพลตเพื่อทิ้ง Complete Media ที่อยู่ในหลุมออกให้หมด เช็ดเพลตด้วยผ้าก๊อตสปราศจากเชื้อแล้วเติมตัวกระตุ้นและเซลล์อย่างละ 50 ไมโครลิตร ต่อหลุม จากนั้นนำเพลตเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และมีความชื้นสัมพัทธ์ 90% ห้ามเคลื่อนย้ายเพลตขณะบ่มเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เมื่อบ่มครบ 18-24 ชั่วโมงแล้วคว่ำเพลตเพื่อทิ้งเซลล์ (ทิ้งใน 10 % โซเดียมไฮโปคลอไรต์ หรือสารฆ่าเชื้อชนิดอื่น) ล้างเพลตด้วย 0.05% tween<sup>®</sup> 20-PBS Wash Buffer (PBS จำนวน 0.988 g และ tween<sup>®</sup> 20 จำนวน 0.05 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) จำนวน 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม ละลาย Anti-Human Interferon gamma mAb 7-B6-1-Biotin 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Mabtech ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ด้วย 0.5% BSA-PBS Diluent (Albumin Bovine จำนวน 0.5 กรัม ละลายใน DPBS 100 มิลลิลิตร) ให้ได้ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่สารละลายละลาย Anti-Human Interferon gamma mAb 7-B6-1-Biotin จำนวน 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.05% tween<sup>®</sup> 20-PBS Wash Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม จำนวน 6 ครั้ง

เตรียมสารละลายเอปี้ซีโดยใช้ Vectastain<sup>®</sup> ABC kit (Vector ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ใส่สารละลายเอ และบี อย่างละ 2 หยดลงในสารละลาย 0.05% tween<sup>®</sup> 20-PBS (tween<sup>®</sup> 20 จำนวน 50 ไมโครลิตร ละลายใน DPBS 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายเอก่อนและเขย่าให้ผสมกันดี แล้วจึงเติมสารละลายบี เขย่าสารละลายให้ผสมกันดี การเตรียมสารละลายเอปี้ซี ต้องเตรียมไว้ล่วงหน้าก่อนใช้งานอย่างน้อย 20 นาที เติมสารละลายที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วย PBS Wash Buffer (สารละลาย PBS 0.988 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม จำนวน 6 ครั้ง

การเตรียมสารละลายเอปี้ซีซับสเตรตโดยใช้ชุด Peroxidase Substrate AEC kit (Vector ประเทศสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี) ซึ่งประกอบด้วยสาร 3 ชนิดได้แก่ 1.) บัฟเฟอร์ 2.) สารละลายเอปี้ซี และ 3.) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การเตรียมเริ่มต้นโดยการเติมบัฟเฟอร์ สารละลายเอปี้ซี และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จำนวน 4 หยด 6 หยด และ 4 หยดต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ การเติมสารแต่ละชนิดเมื่อเติมสารแล้วให้เขย่าให้ผสมกันดีก่อน ก่อนที่จะเติมสารลำดับถัดไป จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ใส่สารละลายเอปี้ซีซับสเตรตปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยล้างด้วยน้ำเปล่าหลายๆ ครั้ง คว่ำเพลตลงบนกระดาษชำระและทำให้แห้ง จากนั้นฝังไว้ในที่มืด 1 คืน ถ่ายรูปสไลด์ด้วยเครื่อง C.T.L.



ImmunoSpot capture และนับจำนวนสปอตด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 5.0 Professional DC คำนวณจำนวนสปอตจากผลการทดลองที่ได้ จำนวนสปอตเฉลี่ยในหลุมทดสอบลบด้วยจำนวนสปอตเฉลี่ยในหลุม Negative control และคูณด้วย 5 จะได้จำนวนสปอตต่อ PBMCs 1 ล้านเซลล์ อาสาสมัครที่มีการตอบสนองต่อสารกระตุ้นคือ ต้องมีจำนวนสปอตมากกว่าหรือเท่ากับ 55 sfc/ล้านเซลล์ และมีค่ามากกว่าค่าของ Negative control 4 เท่า

### 3.6 การวิเคราะห์ผลด้วยหลักสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองในครั้งนี้ใช้โปรแกรม SPSS statistic ver.17 และใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Non parametric เนื่องจากจำนวนกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อยและผลการทดสอบการแจกแจงข้อมูลพบว่าการแจกแจงของข้อมูลเป็นแบบ Non parametric ดังนั้นจึงใช้การทดสอบทางสถิติเป็นแบบ Non parametric คือ การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยค่าเฉลี่ยมัธยฐาน ใช้การทดสอบ Mann-Whitney, Kruskal-wallis และ Chi-square เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ระดับนัยสำคัญ  $\alpha = 0.05$  และหาความสัมพันธ์โดยใช้ Pearson Correlation ดังนั้นการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างจึงใช้การเทียบค่าเฉลี่ยมัธยฐาน (108)

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดตัวอย่างละ 24 มิลลิลิตร จากอาสาสมัครผู้ติดเชื้อ HIV ที่เข้ารับบริการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย จำนวน 23 คน แบ่งอาสาสมัครเป็นสามกลุ่ม คืออาสาสมัครกลุ่มที่ 1 กลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV monoinfected คือกลุ่มตัวอย่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่รับยาต้านไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่จีพีโอเวียร์ กลุ่มนี้มีตัวอย่างจำนวน 11 คน เพศชาย 8 คน เพศหญิง 3 คน มีอายุระหว่าง 27-56 ปี มีค่ามัธยฐานของ CD4+T cell count เท่ากับ 346 เซลล์ต่อไมโครลิตร อาสาสมัครกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV monoinfected และรับยาจีพีโอเวียร์ ซึ่งเป็นสูตรยาที่มียา NVP และมีผลกระทบต่อตับ ทำให้เกิดอาการตับอักเสบได้ กลุ่มนี้มีตัวอย่างจำนวน 8 คน เพศชาย 3 คน เพศหญิง 5 คน มีอายุระหว่าง 28-47 ปี มีค่ามัธยฐานของ CD4+T เซลล์ count เท่ากับ 749 เซลล์ต่อไมโครลิตร และอาสาสมัครกลุ่มที่ 3 กลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd กลุ่มนี้มีตัวอย่างจำนวน 4 คน เพศชาย 1 คน เพศหญิง 3 คน มีอายุระหว่าง 34-58 ปี มีค่ามัธยฐานของ CD4+T cell count 288 เซลล์ต่อไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การจำแนกและรายละเอียดของกลุ่มตัวอย่างกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3

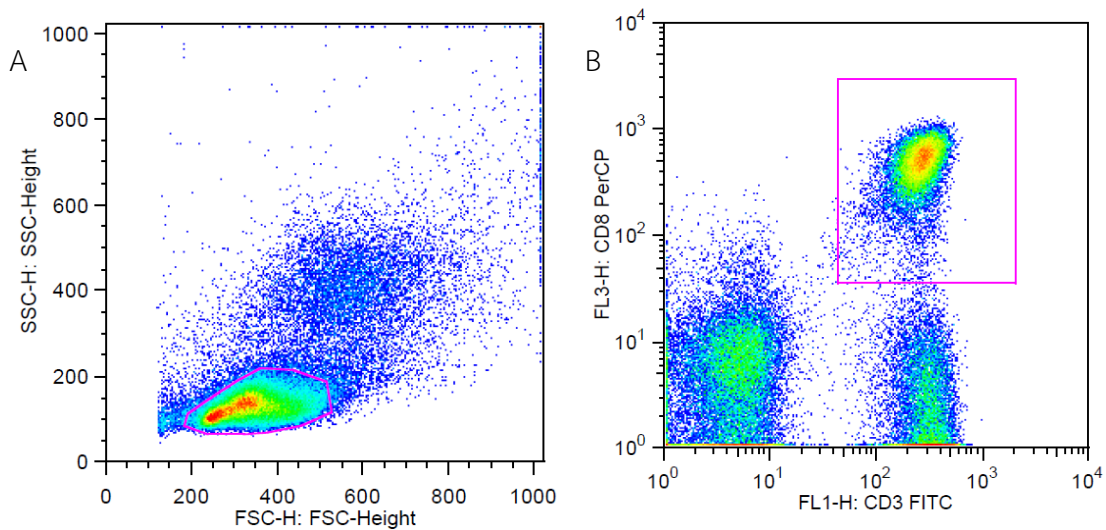
	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	รวม
จำนวนตัวอย่าง (คน)	11	8	4	23
เพศชาย/เพศหญิง (คน)	8/3	3/5	1/3	12/11
อายุ (ปี) (ช่วงอายุระหว่าง)	42 (27-56)	38 (28-47)	41.5 (34-58)	42 (27-58)
CD4+T cell count (เซลล์ต่อไมโครลิตร) (ค่าต่ำสุด-ค่าสูงสุด)	346 (111-615)	749 (117-1019)	288 (68-517)	351 (68-1019)

อาสาสมัครกลุ่มที่ 1 รับยาต้านเอชไอวี Zilavir, Stocrin, 3TC, Viread, Ricovir, Atripla, Lamivir, Stavir, TDF และ EFV อาสาสมัครในกลุ่มที่ 2 รับยาต้านไวรัสจีพีโอเวียร์เอส ขณะที่อาสาสมัครในกลุ่มที่ 3 จำนวน 4 คน รับยาแตกต่างกันดังนี้ 1.) จีพีโอเวียร์เอส 2.) Zilavir และ Neravir 3.) Zilavir และ 4.) Ricovir

## 2 Flow cytometry

การวัดการแสดงออกของ Cytolytic molecule ของ CD8+T cell ได้แก่ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้มีความสำคัญต่อการทำลายเซลล์ติดเชื้อ การแสดงออกของโมเลกุลเหล่านี้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ติดเชื้อของภูมิคุ้มกัน การวัดปริมาณการแสดงออกของ Cytolytic molecule โดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ที่ conjugate กับ monoclonal antibody โมเลกุลต่างๆ มีดังนี้ FITC mouse Anti-Human CD3, PerCP mouse Anti-Human CD8, PE mouse Anti-Human Granzyme A, PE mouse Anti-Human Granzyme B และ PE Anti Perforin วิเคราะห์ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกย้อมสีแล้ว พร้อมแปลผลด้วยเครื่อง FACs caliber ได้ผลการทดลองดังนี้

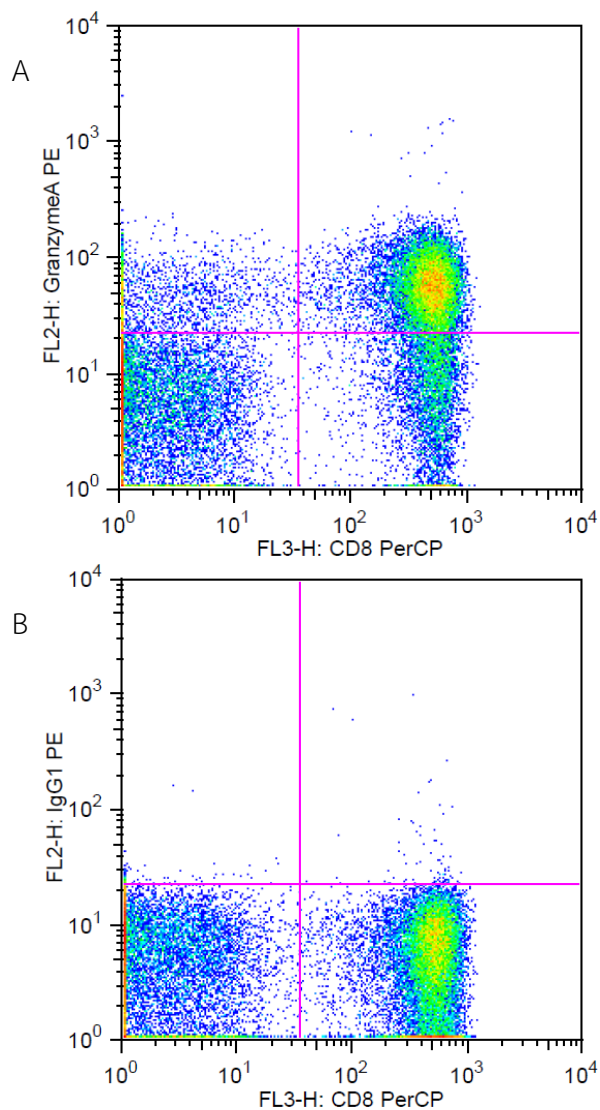
การเปรียบเทียบค่า Forward Scatter (FSC) กับค่า Side Scatter (SSC) โดยแกน X คือค่า FSC-H แกน Y คือค่า SSC-H เพื่อหากกลุ่มประชากรเซลล์ตัวอย่าง Lymphocytes และได้ลักษณะกลุ่มประชากรดังรูปที่ 24 กลุ่มประชากรที่ถูกเลือกคือ Lymphocytes เลือกค่า Lymphocytes ดังกล่าวมาเขียนกราฟเปรียบเทียบค่า FL1-H CD3 FITC แกน X กับ FL3-H CD8 PerCP แกน Y เพื่อเลือกกลุ่มประชากรเซลล์ที่ให้ผลบวก CD3+CD8+ ดังรูปที่ 24 จากนั้นจึงนำค่ากลุ่มประชากรเซลล์ที่ให้ผลบวก CD3+CD8+ ไปเปรียบเทียบกับ Cytolytic molecule ต่อไป



รูปที่ 24 ลักษณะของเซลล์ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง FACS caliber A.) เปรียบเทียบลักษณะเซลล์ด้วยค่า FSC-H ในแกน X และค่า SSC-H ในแกน Y เพื่อเลือกเอากลุ่มประชากรเซลล์ Lymphocytes ไปเขียนกราฟดังรูป B.) ที่แสดงลักษณะกลุ่มประชากรเซลล์ Lymphocytes ที่ย้อมด้วย FITC mouse Anti-Human CD3 แกน X และ PerCP mouse Anti-Human CD8 แกน Y และกลุ่มเซลล์ตัวอย่างที่เลือกในรอบสี่เหลี่ยมคือ กลุ่มประชากรเซลล์ที่ให้ผลบวก CD3+CD8+T cell

## 2.1 Granzyme A

ค่ามัธยฐานสัดส่วนจำนวนเซลล์ CD8+T cell ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme A ในกลุ่มที่ 1 HIV monoinfected เท่ากับ 28.04% กลุ่มที่ 2 HIV monoinfected ที่รับยาจีพีโอเวียร์ เท่ากับ 25.72% กลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd เท่ากับ 53.73% ซึ่งกลุ่มที่ 3 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 1 และ 2 โดยกลุ่มที่ 3 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.030$ ) กลุ่มที่ 1 กับกลุ่มที่ 2 ไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 1.000$ ) เช่นเดียวกับกับกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 ไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.100$ ) ดังตารางที่ 3

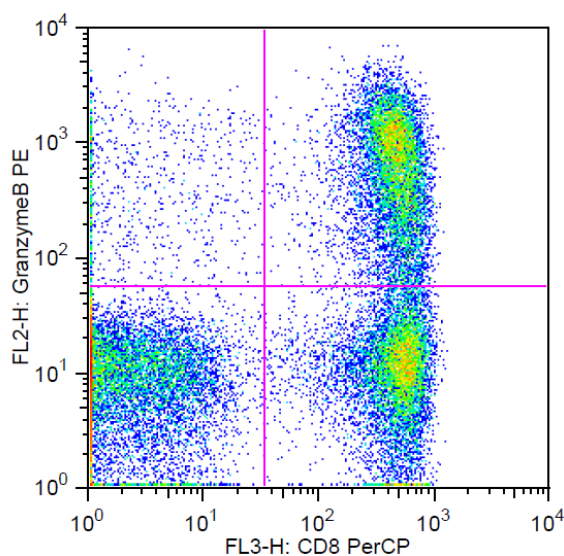


รูปที่ 25 ลักษณะของประชากรเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Granzyme A A.) คือ ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกย้อมด้วย PE mouse Anti-Human Granzyme A B.) คือ ลักษณะของประชากรเซลล์ที่ถูกย้อมด้วย PE mouse Anti-IgG1 ซึ่งเป็น Negative control ของ Granzyme A; กลุ่มประชากรเซลล์ในช่องบนขวา คือ กลุ่มที่ย้อมติดสี CD8+Granzyme A+ และกลุ่มประชากรเซลล์ในช่องล่างขวา คือ กลุ่มที่ย้อมติดสี CD8+ แต่ให้ผลลบ Granzyme A- (CD8+Granzyme A-)

## 2.2 Granzyme B

ค่ามัธยฐานสัดส่วนจำนวนเซลล์ CD8+T cell ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme B ในกลุ่มที่ 1 HIV monoinfected เท่ากับ 67.60% กลุ่มที่ 2 HIV monoinfected ที่รับยา GPO vir

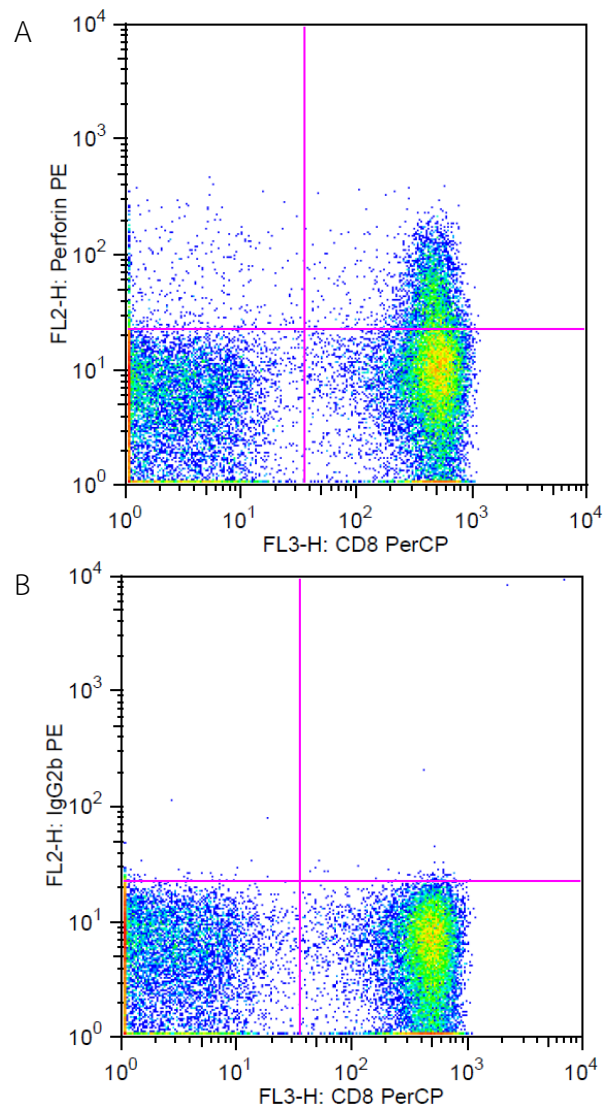
เท่ากับ 53.80% กลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd เท่ากับ 66.05% ดังตารางที่ 3 ค่าที่ได้จากทั้ง 3 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 2 ค่า  $p = 0.351$  กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.847$  และ กลุ่มที่ 2 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.570$



รูปที่ 26 ลักษณะของประชากรเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Granzyme B ของบนขวาคือ กลุ่มประชากรเซลล์ที่ให้ผลบวก CD8+Granzyme B+ ล่างขวาคือ CD8+Granzyme B-

## 2.3 Perforin

ค่ามัธยฐานจำนวนเซลล์ CD8+T cell ที่มีการแสดงออกของโมเลกุล Perforin ในกลุ่มที่ 1 HIV monoinfected เท่ากับ 36.28% กลุ่มที่ 2 HIV monoinfected ที่รับยาจีพีไอเวียร์เท่ากับ 13.15% กลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd เท่ากับ 28.19% ซึ่งกลุ่มที่ 1 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 และ 3 และกลุ่มที่ 3 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 แต่ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 3 กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 2 ค่า  $p = 0.051$  กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.847$  และ กลุ่มที่ 2 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.461$

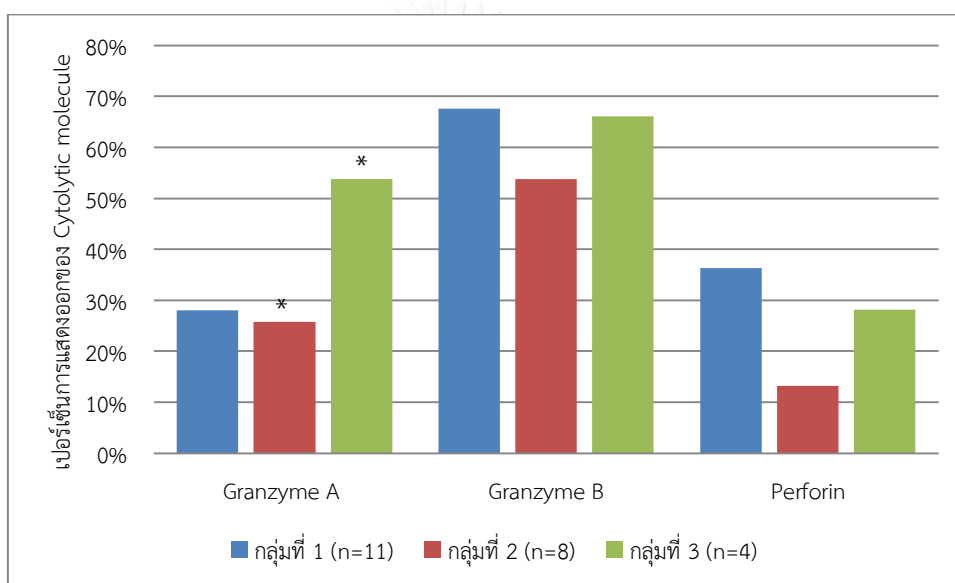


รูปที่ 27 ลักษณะของประชากรเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Perforin A.) คือ ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกย้อมด้วย PE Perforin B.) คือ ตัวอย่างเซลล์ที่ถูกย้อมด้วย PE Anti IgG2b ซึ่งเป็น Negative control ของ Perforin กลุ่มประชากรเซลล์ในช่องบนขวา คือ กลุ่มที่ย้อมติดสี CD8+ Perforin+ ล่างขวาคือ CD8+ Perforin-

ตารางที่ 3 ค่ามัธยฐานสัดส่วนการแสดงออกของ cytolytic molecule ใน CD8+T cell

โมเลกุลที่แสดงออก	กลุ่มที่ 1 (n=11)	กลุ่มที่ 2 (n=8)	กลุ่มที่ 3 (n=4)
Granzyme A (min-max)	28.04 % (5.33-67.32)	25.72 %* (15.91-46.93)	53.73 %* (38.43-70.66)
Granzyme B (min-max)	67.60 % (41.00-86.10)	53.80 % (23.20-78.20)	66.05 % (50.40-82.10)
Perforin (min-max)	36.28 % (17.50-62.42)	13.15 % (6.40-54.65)	28.19 % (10.66-54.55)

\* คือ กลุ่มที่ 3 มีจำนวนเซลล์ที่มีการแสดงออกของ Granzyme A มากกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.048$ )



รูปที่ 28 กราฟเปรียบเทียบค่ามัธยฐานสัดส่วนการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ของ CD8+T cell เทียบระหว่างกลุ่มที่ 1, 2 และ 3

#### 2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า CD4+T cell count กับ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin

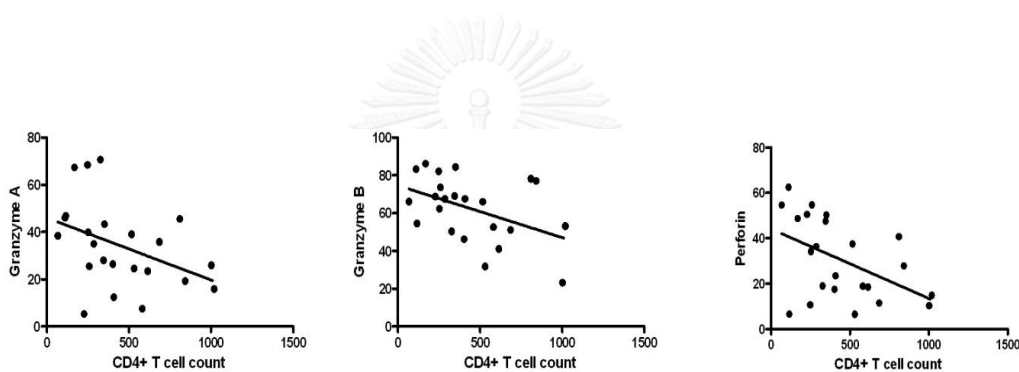
การเปรียบเทียบค่า CD4+T cell count กับค่าการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ใน CD8+T cell พบความสัมพันธ์ Pearson Correlation ดังแสดงในตารางที่ 4 ค่า CD4+T cell count กับ Granzyme A มีค่า Pearson Correlation เท่ากับ -0.405 Granzyme B เท่ากับ -0.452 และ Perforin เท่ากับ -0.478 ซึ่งทั้งหมดเป็นความสัมพันธ์แบบผกผัน ค่า



Granzyme B และ Perforin มีความสัมพันธ์กับค่า CD4+ T cell count อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.030$  และ  $0.021$  ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 ค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า CD4+ T cell count กับ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin

	ค่าความสัมพันธ์ของ CD4+ T cell count	
	Pearson Correlation	Significant if value < 0.05
Granzyme A	-0.405	0.056
Granzyme B	-0.452	0.030
Perforin	-0.478	0.021



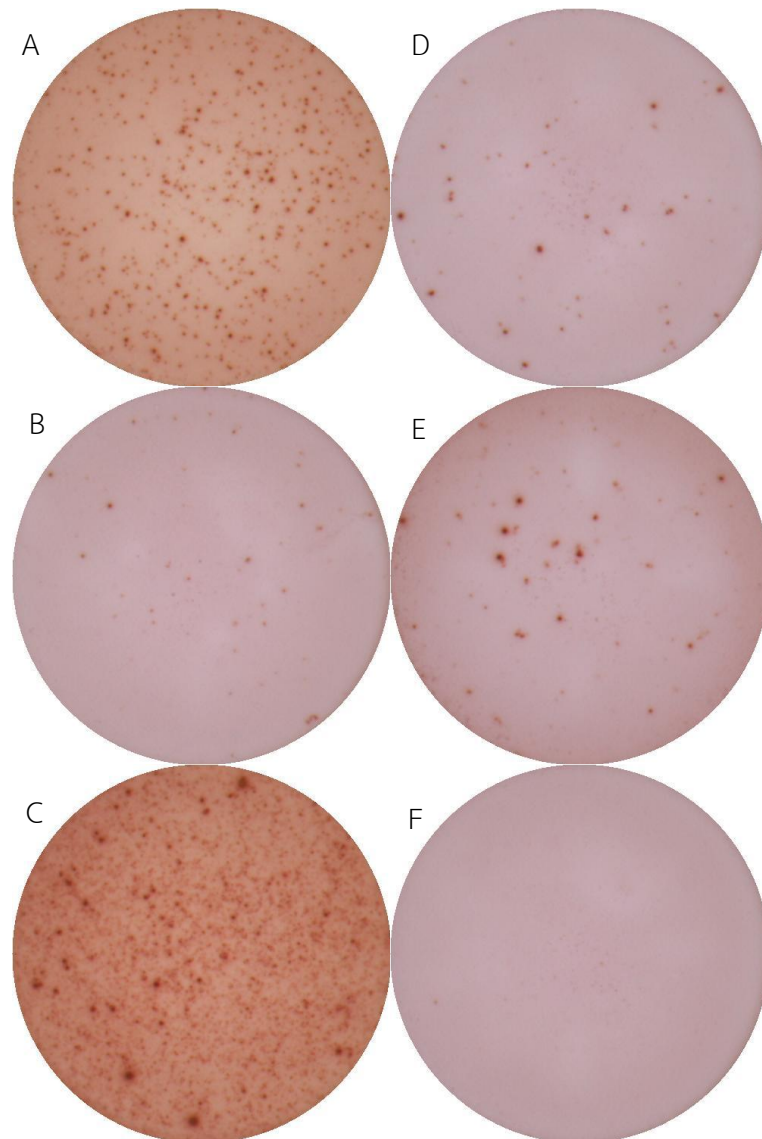
รูปที่ 29 แสดงความสัมพันธ์ Pearson Correlation ระหว่างค่า CD4+ T cell count กับ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin

### 3 ELISpot

การทดสอบการตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool พบว่า ตัวอย่างกลุ่มที่ 1 จากจำนวน ตัวอย่าง 11 คน ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool เท่ากับ 8 คน คิดเป็น 72.73% ไม่มีการตอบสนองเท่ากับ 3 คน คิดเป็น 27.27% กลุ่มที่ 2 จากตัวอย่างจำนวน 8 คน มีคนที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool เท่ากับ 7 คน คิดเป็น 87.50% ไม่มีการตอบสนองเท่ากับ 1 คน คิดเป็น 12.50% และกลุ่มที่ 3 จากตัวอย่างจำนวน 4 คน มีคนที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool เท่ากับ 3 คน คิดเป็น 75.00% ไม่มีการตอบสนองเท่ากับ 1 คน คิดเป็น 25.00% ดังตารางที่ 5

การทดสอบการตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool พบว่า ตัวอย่างกลุ่มที่ 1 จากจำนวน ตัวอย่าง 11 คนมีคนที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool เท่ากับ 5 คน คิดเป็น 45.45% ไม่มีการตอบสนองเท่ากับ 6 คน คิดเป็น 54.55% กลุ่มที่ 2 จากตัวอย่างจำนวน 8 คน มีคนที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool เท่ากับ 7 คน คิดเป็น 87.50% ไม่มีการตอบสนองเท่ากับ 1 คน คิดเป็น 12.50% และกลุ่มที่ 3 จากตัวอย่างจำนวน 4 คน มีคนที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool เท่ากับ 1 คน คิดเป็น 25.00% ไม่มีการตอบสนองเท่ากับ 3 คน คิดเป็น 75.00% ดังตารางที่ 5

จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool กลุ่มที่ 2 มีมากกว่า กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 2 ค่า  $p = 0.435$  กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.930$  และ กลุ่มที่ 2 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.584$  ขณะที่จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool กลุ่มที่ 2 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 โดยกลุ่มที่ 2 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.030$ ) กลุ่มที่ 1 มากกว่ากลุ่มที่ 3 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.475$ )



รูปที่ 30 ลักษณะ spot ที่เกิดจากการตอบสนองของ PBMCs ของอาสาสมัคร A.) และ D.) คือ การตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool B.) และ E.) คือ การตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool C.) คือ Positive control ซึ่งกระตุ้นด้วย PHA และ F.) คือ Negative control

ตารางที่ 5 จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool และ HIV-1 Env peptide pool ; \*กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.030$ )

ชนิด Antigen	กลุ่มที่ 1 (คน) (n=11)	กลุ่มที่ 2 (คน) (n=8)	กลุ่มที่ 3 (คน) (n=4)
จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool	8 (72.73%)	7 (87.50%)	3 (75.00%)
จำนวนอาสาสมัครที่ไม่มีการตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool	3 (27.27%)	1 (12.50%)	1 (25.00%)
จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool	5 (45.45%)	7 (87.50%)*	1 (25.00%)*
จำนวนอาสาสมัครที่ไม่มีการตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool	6 (54.55%)	1 (12.50%)	3 (75.00%)

จำนวน spot forming count (sfc) ต่อเซลล์ล้านเซลล์ ของ PBMCs ที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool ในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 คือ 252, 135 และ 1,251 sfc ต่อล้านเซลล์ ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 แต่ทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 2 ค่า  $p = 0.600$  กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.518$  และ กลุ่มที่ 2 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.283$  จำนวน sfc ต่อเซลล์ล้านเซลล์ ของ PBMCs ที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide pool ในกลุ่มที่ 1, กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 คือ 62, 78 และ 18 sfc ต่อล้านเซลล์ ตามลำดับ (ดังตารางที่ 6) และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 2 ค่า  $p = 0.272$  กลุ่มที่ 1 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.249$  และ กลุ่มที่ 2 กับ กลุ่มที่ 3 ค่า  $p = 0.368$

ตารางที่ 6 ค่ามัธยฐานจำนวน sfc ต่อล้านเซลล์ของ PBMCs ที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide pool และ HIV-1 Env peptide pool

ชนิด Antigen	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3
HIV-1 Gag peptide pool (ต่ำสุด-สูงสุด)	252 (13-3,242)	135 (42-1,738)	1251 (46-3,412)
HIV-1 Env peptide pool (ต่ำสุด-สูงสุด)	62 (0-1,898)	78 (7-1,568)	18 (13-368)

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะชนิด CD8+T cell มีบทบาทสำคัญต่อการทำลายเซลล์ติดเชื้อในผู้ติดเชื้อเอชไอวี เนื่องจากสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อแบบเฉียบพลันก่อนการปรากฏของแอนติบอดี (13) การศึกษาครั้งนี้ศึกษาผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีชนิด CD8+T cells ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี โดยแบ่งอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 HIV monoinfected รับประทานไวรัสชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่กลุ่มยาจีพีโอเวียร์ กลุ่มที่ 2 HIV monoinfected ที่รับประทานไวรัสชนิดจีพีโอเวียร์ ซึ่งมีตัวยา Nevirapine (NVP) ที่มีผลกระทบต่อตับ (51, 107) และกลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd โดยเปรียบเทียบอาสาสมัครกลุ่ม HIV monoinfected ในกลุ่มที่ 1 และ 2 เพื่อเปรียบเทียบผลของการรับยาจีพีโอเวียร์ที่มีผลกระทบต่อตับว่าจะมีผลต่อตัวแปรในการทดลองหรือไม่ เนื่องมาจากอาสาสมัครในกลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd รับประทานจีพีโอเวียร์จำนวน 1 คน รับประทาน Neravir จำนวน 1 คน และอีก 2 คนไม่รับประทานจีพีโอเวียร์หรือ Neravir การศึกษาครั้งนี้ อาสาสมัครในกลุ่มที่ 1 รับประทานแตกต่างกัน โดยทุกคนได้รับยาในกลุ่ม NRTIs จำนวน 1-2 ชนิด และยาในกลุ่ม NNRTIs จำนวน 1 ชนิด อาสาสมัครกลุ่มที่ 2 รับประทานจีพีโอเวียร์ ซึ่งประกอบด้วยยา 3 ชนิด ได้แก่ d4T, 3TC และ NVP โดยที่ d4T และ 3TC เป็นยาในกลุ่ม NRTIs NVP เป็นยาในกลุ่ม NNRTIs อาสาสมัครในกลุ่มที่ 3 จำนวน 2 คน รับประทานในกลุ่ม NRTIs และ NNRTIs ขณะที่อาสาสมัครอีก 2 คน รับประทานเฉพาะในกลุ่ม NRTIs จำนวน 1-2 ชนิด (59)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การตรวจวัดปริมาณ CD8+ T cells ที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวี ซึ่งตรวจวัดโดยวิธี IFN gamma ELISpot โดยใช้ HIV-1 Gag peptide pool และ HIV-1 Env peptide pool เป็นตัวกระตุ้น การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน การศึกษาในครั้งนี้ใช้ HIV-1 peptide เป็นตัวกระตุ้นเซลล์ เนื่องมาจากในประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ HIV-1 และยังไม่พบการระบาดของสายพันธุ์ HIV-2 (32) ผลการศึกษาพบว่าจำนวนอาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่มมีการตอบสนองของ HIV specific CD8+T cell ต่อ HIV-1 Gag peptide ใกล้เคียงกัน คือ การตอบสนองในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เท่ากับ 72.73%, 87.50% และ 75.00% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างของการตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide ในแต่ละกลุ่ม แต่เมื่อดูผลการตอบสนองของ HIV specific CD8+T cell ต่อ HIV-1 Env peptide พบว่าในกลุ่มที่ 2 คือกลุ่ม HIV monoinfected ที่รับประทานไวรัสชนิดจีพีโอเวียร์ มีจำนวนคนที่ตอบสนองมากที่สุด ขณะที่กลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd มีจำนวนการตอบสนองน้อยที่สุด โดยจำนวนคนที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide

ในกลุ่มที่ 2 มีมากกว่ากลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญ (87.50% ต่อ 25.00%,  $p=0.030$ ) อาสาสมัครกลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd มีการตอบสนองน้อยกว่ากลุ่ม HIV monoinfected ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการติดเชื้อร่วมกันทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันลดลง ดังที่มีรายงานว่า กลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd จะมีภูมิคุ้มกันน้อยกว่ากลุ่ม monoinfected (12) และในกลุ่มที่รับยาที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 พบว่าจำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide และ HIV-1 Env peptide และจำนวนสเปคตที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide และ HIV-1 Env peptide ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่าการรับยาจีพีโอเวียร์หรือยาชนิดอื่นๆ ไม่มีผลกระทบต่อตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อ HIV-1 Gag peptide และ HIV-1 Env peptide

จากผลการทดลองพบว่าการตอบสนองของ HIV-1 specific T cell ต่อ HIV-1 Gag peptide มีมากกว่า HIV-1 Env peptide ทั้งนี้อาจเนื่องจากโครงสร้างส่วน Env มีอัตราการกลายพันธุ์ได้มากกว่าโครงสร้างส่วน Gag ดังนั้นการตอบสนองต่อ HIV-1 Env จึงต่ำกว่า HIV-1 Gag (115, 116) การศึกษาของ Edwards และคณะ ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี พบว่าการตอบสนองของ CD8+T cell ต่อ Peptide pool และโปรตีนของไวรัสเอชไอวี ได้แก่ HIV-1 Gag และ Env ด้วยวิธี IFN gamma ELISpot Assay พบว่าอาสาสมัครมีการตอบสนองต่อ Gag มากที่สุด (96%) และตอบสนองต่อ Env เท่ากับ 59% ในการทดลองครั้งนี้พบว่าอาสาสมัครมีการตอบสนองต่อ HIV-1 Gag มากกว่า HIV-1 Env เช่นกัน Edwards และคณะ พบว่าการตอบสนองของ CD8+T cell ต่อจำนวนรวมของ Gag peptide pool มีความสัมพันธ์กับระยะของการเกิดโรค โดยการตอบสนองนี้มีความสัมพันธ์กันกับค่า CD4+T cell count ( $r=0.54$ ) และมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับค่า Viral Load ( $r=-0.60$ ) (117) ขณะที่การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษากับ Peptide pool เดียว (Gag =122 peptides และ Env = 166 peptides) ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่ามีความถี่ในการตอบสนองของแต่ละ pool อย่างไร

การตอบสนองของ HIV-1 specific T cell ต่อ HIV-1 Gag Peptide ในกลุ่มที่ 3 พบว่าจำนวนสเปคตมีมากกว่ากลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2 แต่ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จำนวนสเปคตที่มากกว่าแสดงถึงความแรงของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ซึ่งการศึกษาของ Jiao และคณะ ซึ่งเปรียบเทียบการตอบสนองของ HIV-1 specific CD8 T cell ระหว่างกลุ่ม LTNPs, กลุ่ม Asymptomatic progressors (CD4+T cell counts 350 - 500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และ กลุ่ม Progressors (CD4 counts น้อยกว่า 350 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) พบว่าความแรงของการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (จำนวนสเปคต) ไม่แตกต่างกัน (118) ดังนั้นจำนวนสเปคตในกลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd ที่มากกว่าไม่ได้บ่งบอกว่ามีภูมิคุ้มกันที่ดีกว่ากลุ่มที่ 1 และ 2 การตอบสนองของ HIV-1 specific T cell ต่อ HIV-1 Env Peptide พบว่าทั้ง 3 กลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบ

ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสไปดและค่า CD4+T cell count ของการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าจำนวนสไปดกับค่า CD4+T cell count ไม่มีความสัมพันธ์กัน

มีรายงานการศึกษาในผู้ติดเชื้อแบบ HIV/HCV coinfectd เกี่ยวกับการสูญเสียภูมิคุ้มกันชนิด T cells ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธี ELISpot พบว่าผู้ป่วยกลุ่ม HIV/HCV coinfectd มีการสูญเสียภูมิคุ้มกันชนิด T cells ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบี การตอบสนองของ CD4+T cell ต่อโปรตีนของไวรัสตับอักเสบบี กลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd มีการตอบสนองที่ต่ำกว่ากลุ่ม HCV monoinfected ( $p < 0.0001$ ) (93) แต่การศึกษาภูมิคุ้มกันชนิด T cell ที่จำเพาะต่อเอชไอวีในผู้ติดเชื้อแบบ HIV/HCV coinfectd มีรายงานการศึกษาจำนวนน้อย Harcourt และคณะ รายงานการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย HIV/HCV coinfectd ด้วยวิธี ELISpot assay และกระตุ้นเซลล์ด้วยโปรตีน HIV-p24 antigen พบว่าอาสาสมัครจำนวน 53 คน มีการตอบสนองต่อ antigen 20 คน คิดเป็น 37.73% แต่การศึกษานี้ไม่ได้เปรียบเทียบกับอาสาสมัครกลุ่ม HIV monoinfected (93) การศึกษาในครั้งนี้ กลุ่มผู้ติดเชื้อแบบ HIV/HCV coinfectd มีการตอบสนองต่อ HIV-1 Gag จำนวน 3 คน ( $n=4$ ) คิดเป็น 75.00% การตอบสนองของอาสาสมัครที่แตกต่างกันนี้ เนื่องมาจากการศึกษาในครั้งนี้ใช้ Peptide pool เป็นสารกระตุ้น และขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่น้อยกว่า ขณะที่ Harcourt และคณะ ใช้โปรตีน p24 เป็นสารกระตุ้นและศึกษาการตอบสนองของ CD4+T cell (93)

การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme A ของ CD8+T cell พบว่ากลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd มีค่ามากกว่า อาสาสมัคร HIV monoinfected ในกลุ่มที่ 1 และ 2 โดยพบว่ากลุ่มที่ 3 มีปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A มากกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ผลของการแสดงออกของ Granzyme A ของ CD8+T cell แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม HIV monoinfected และ HIV/HCV coinfectd คือ กลุ่ม HIV/HCV coinfectd มีการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme A ของ CD8+T cell สูงขึ้น การติดเชื้อร่วมกันอาจกระตุ้นการแสดงออกของ Granzyme A ให้มากขึ้นและอาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อร่วมกันเหนี่ยวนำการสร้าง Granzyme A ของ CD8+T cell เพิ่มขึ้น การแสดงออกของ Granzyme A จึงพบมากในกลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 และ 2 ขณะที่การแสดงออกของโมเลกุล Granzyme B กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าใกล้เคียงกัน การแสดงออกของโมเลกุล Perforin กลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 3 มีค่าใกล้เคียงกัน แต่มีค่าน้อยในกลุ่มที่ 2 แต่ทั้งสามกลุ่มไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ Haridas และคณะ ศึกษาการแสดงออกของ Granzyme A และ Perforin ในเด็กที่ติดเชื้อเอชไอวีและได้รับยาต้านไวรัส เทียบกับคนปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี ปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีมากกว่าในคนปกติ (32.5% กับ 13.9%  $p=0.006$ ) ขณะที่ปริมาณ Perforin ไม่แตกต่างกัน คนที่ติด

เชื้อเอชไอวีจะมีการแสดงออกของ Granzyme A สูงกว่าเมื่อเทียบกับคนปกติ (110) การทดลองของ Haridas และคณะ แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ Granzyme A ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะสูงกว่าคนปกติ ค่าผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ คือ การแสดงออกของ Granzyme A มีปริมาณสูงขึ้นในกลุ่มที่ติดเชื้อ Coinfected เมื่อเทียบกับ Monoinfected ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อหลายชนิดกระตุ้นการแสดงออกของ Granzyme A ให้สร้างในปริมาณมากขึ้น ในกลุ่มที่รับยาแตกต่างกัน ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 พบว่าปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A และ Granzyme B ไม่แตกต่างกัน ขณะที่ปริมาณการแสดงออกของ Perforin กลุ่มที่ 1 มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการรับยาจีทีโอเวียร์หรือยาชนิดอื่นๆ ไม่ทำให้ปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin แตกต่างกัน

รายงานของ Nunez และคณะ ที่ศึกษาเกี่ยวกับการ Apoptosis ของ CD4+T cell ( $p=0.04$ ) และ CD8+ T cell ( $p=0.02$ ) พบว่าการ Apoptosis ของอาสาสมัครในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd มากกว่าอาสาสมัครกลุ่ม HIV monoinfected ทั้ง CD4+T cell ( $p=0.04$ ) และ CD8+ T cell ( $p=0.02$ ) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทำให้มีการ Apoptosis เพิ่มขึ้น (96) ขณะที่ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin เป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการ Apoptosis (111, 112) จากรายงานดังกล่าว การ Apoptosis พบมากในอาสาสมัครกลุ่ม HIV/HCV coinfectd ซึ่ง Granzyme A, Granzyme B และ Perforin เกี่ยวข้องกับการ Apoptosis แต่การ Apoptosis มีมาจากหลายสาเหตุ อาจเกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนจากเชื้อเอชไอวี ได้แก่ Env, Nef, Vpu, Vpr เป็นต้น (45, 46) หรือการกระตุ้นการแสดงออกของ Fas ligand ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ Apoptosis (101, 102) การแสดงออกของ Granzyme A ในปริมาณมากในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd นี้ อาจไม่เกี่ยวข้องกับการ Apoptosis แต่การแสดงออกของ Granzyme A ก็พบในปริมาณมากในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd

แม้ว่า Granzyme A, Granzyme B และ Perforin จะเป็นประโยชน์ในแง่ของการทำลายเซลล์ติดเชื้อ แต่การแสดงออกที่มากเกินไป เกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มากเกินไป ซึ่งส่งผลเสียต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (13, 47) การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มากเกินไปทำให้เกิด CD4+ T cell depletion (47) ดังจะเห็นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ CD4+T cell count และการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin การเปรียบเทียบปริมาณ CD4+T cell count กับการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์แบบผกผัน กล่าวคือ เมื่อปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ลดลง ปริมาณ CD4+T cell count จะเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณการแสดงออกที่มากเกินไปอาจมี



ผลทำให้ปริมาณ CD4+T cell count ลดลง แต่การทดลองนี้ไม่สามารถกล่าวได้ว่าปริมาณ CD4+T cell count ที่ลดลงเป็นผลมาจากการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ที่เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการลดลงของ CD4+T cell count เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น ผลมาจากการทำลายของไวรัส (44) Apoptosis ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของโปรตีนจากเชื้อเอชไอวี ได้แก่ Env, Nef, Vpu, Vpr (45, 46) แต่การศึกษาครั้งนี้บอกได้ถึงความสัมพันธ์ของปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin กับ CD4+T cell count ดังมีรายงานของ Haridas และคณะ พบว่าปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณ CD4+T cell count ( $r=-0.54$ ,  $p=0.008$ ) (110)

การแปลความหมายความสัมพันธ์จากค่า Pearson correlation และ ค่า Significant (p value) ของความสัมพันธ์ระหว่าง Granzyme B และ Perforin กับ CD4+T cell count จากผลการทดลองตารางที่ 4 และรูปที่ 29 ค่า Pearson correlation มีค่าเท่ากับ -0.452 และ -0.478 ตามลำดับ ค่า p value เท่ากับ 0.030 และ 0.021 ตามลำดับดังกล่าว การแปลความหมายใช้ค่าทั้งสองในการแปลผล ค่า Pearson correlation ที่มีค่าใกล้เคียง 1 หรือ -1 แสดงว่าข้อมูลมีความสัมพันธ์กันมาก แต่ถ้าค่า Pearson correlation มีค่าเท่ากับ 0 แสดงว่าข้อมูลนั้นไม่มีความสัมพันธ์กันเลย จากค่าดังกล่าวแสดงว่าตัวแปรมีความสัมพันธ์กันระดับปานกลาง ดังมีงานวิจัยทางด้านเอชไอวีและไวรัสตับอักเสบบีที่ได้รายงานความสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยค่า Pearson correlation ที่พบในรายงานเริ่มต้นที่ 0.349 ( $p=0.009$ ) (113) หรือ -0.4 ( $p=0.05$ ) (114) นอกจากนี้แล้ว การแปลค่าความสัมพันธ์ต้องใช้ค่า p value ด้วย โดยจากการทดลองครั้งนี้ค่า p value ที่ต่ำกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่า CD4+T cell count เป็นค่าที่ใช้ทำนายระยะการดำเนินของโรคเอดส์ พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่ม LTNPs ที่สามารถควบคุมเชื้อได้ดีและไม่แสดงอาการของโรคเป็นเวลามากกว่า 10 ปี มีค่า CD4+T cell count มากกว่า 500 เซลล์ต่อไมโครลิตร และปริมาณไวรัสน้อยกว่า 50 อนุภาคต่อมิลลิลิตร) (109) ขณะที่อาสาสมัครจากการทดลองมีค่า CD4+T cell count ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน กลุ่มที่ 1 มีค่ามัธยฐาน CD4+T cell count เท่ากับ 346 เซลล์ต่อไมโครลิตร กลุ่มที่ 2 มีค่ามัธยฐาน CD4+T cell count เท่ากับ 749 เซลล์ต่อไมโครลิตร กลุ่มที่ 3 มีค่ามัธยฐาน CD4+ T cell count เท่ากับ 288 เซลล์ต่อไมโครลิตร ซึ่งอาสาสมัครกลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd มีค่า CD4+ T cell count ต่ำกว่าอาสาสมัคร HIV monoinfected ในกลุ่มที่ 1 และ 2 มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้ป่วยเอดส์ โดยการวิเคราะห์ห่อภิมาณ (meta-analysis) ในผู้ป่วย HIV/HCV coinfectd และ HIV monoinfected การเพิ่มขึ้นของ CD4+T cell count

หลังจากการเริ่มรับยาต้านไวรัสแบบ HAART ผู้ป่วย HIV/HCV coinfectd มีการเพิ่มขึ้นของ CD4+T cell count น้อยกว่ากลุ่ม HIV monoinfected จำนวน 33 เซลล์ต่อไมโครลิตร (90) จากผลการทดลองครั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าผลของการติดเชื้อแบบ coinfectd ทำให้ปริมาณ CD4+T cell count ต่ำกว่า monoinfected ดังจะเห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3 แต่เนื่องจากค่า CD4+T cell count ระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 3 ไม่ได้แตกต่างกันมาก และการกระจายของข้อมูลมีกว้าง ค่าต่ำสุด สูงสุดห่างกันมาก ตลอดจนกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อย ดังนั้นจึงยังสรุปไม่ได้ว่าการติดเชื้อแบบ coinfectd ทำให้ค่า CD4+T cell count ต่ำกว่าแบบ monoinfected ควรทำการศึกษา โดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น

การเปรียบเทียบ HIV specific T cell ระหว่างกลุ่ม HIV/HCV coinfectd และ HIV monoinfected เราพบความแตกต่างกันในบางตัวแปร ได้แก่ จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide และปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A ซึ่งพบว่ากลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd และกลุ่มที่ 2 HIV monoinfected ที่รับยาจีพีไอเวียร์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เมื่อเทียบกลุ่มที่ 3 กับกลุ่มที่ 1 HIV monoinfected พบว่าไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd อาจมีผลทำให้การตอบสนองของ HIV specific T cell ต่ำลงเมื่อเทียบกับ HIV monoinfected การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีมีผลกระทบต่อภูมิคุ้มกันที่จะไปกำจัดเชื้อเอชไอวี จากรายงานอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อร่วมกันส่งผลเสียต่อภูมิคุ้มกัน (90, 96)



### สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการตอบสนองของ HIV specific CD8+T cell ในผู้ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อ HIV monoinfected ด้วยวิธี IFN gamma ELISpot assay เปรียบเทียบ การแสดงออกของโมเลกุล Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ด้วยวิธี Flow cytometry assay ในตัวอย่างเลือดของอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 23 คน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 HIV monoinfected จำนวน 11 คน กลุ่มที่ 2 HIV monoinfected ที่รับยาจีพีโอเวียร์จำนวน 8 คน และกลุ่มที่ 3 HIV/HCV coinfectd จำนวน 4 คน ผลการทดลองพบว่า การตอบสนองของ HIV specific T cell ในกลุ่มที่ 3 อาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd ต่ำกว่าอาสาสมัครกลุ่ม HIV monoinfected ในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 เล็กน้อย โดยผลการทดลองพบความแตกต่างในบางตัวแปร ได้แก่ จำนวนอาสาสมัครที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide และปริมาณการแสดงออกของ Granzyme A ขณะที่บางตัวแปรยังไม่พบความแตกต่าง ผลการทดลองด้วยวิธี IFN gamma ELISpot assay พบว่าจำนวนตัวอย่างที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Env peptide ของกลุ่มที่ 3 อาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd เท่ากับ 25.00% ซึ่งต่ำกว่าอาสาสมัครผู้ติดเชื้อ HIV monoinfected ในกลุ่มที่ 1 (45.45%) และกลุ่มที่ 2 (87.50%) ซึ่งกลุ่มที่ 3 น้อยกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.03$ ) ขณะที่จำนวนตัวอย่างที่ตอบสนองต่อ HIV-1 Gag peptide ทั้ง 3 กลุ่มใกล้เคียงกัน คือ กลุ่มที่ 1 เท่ากับ 72.73% กลุ่มที่ 2 เท่ากับ 87.50% และกลุ่มที่ 3 เท่ากับ 75.00% ปริมาณการแสดงออกของ โมเลกุล Granzyme A ในกลุ่มที่ 3 อาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV/HCV coinfectd (53.73%) มีปริมาณ มากกว่าอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่มที่ 1 (28.04%) และ กลุ่มที่ 2 (25.72%) โดยกลุ่มที่ 3 มากกว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p=0.048$ ) ปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme B และ Perforin ในอาสาสมัครกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 3 มีในปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ 2 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล Granzyme B มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณ CD4+T cell count ( $r=-0.452$ ,  $p=0.030$ ) และปริมาณการแสดงออกของโมเลกุล Perforin มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณ CD4+T cell count ( $r=-0.478$ ,  $p=0.021$ ) ทั้งวิธี IFN gamma ELISpot assay และ Flow cytometry assay ผลการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ 1 HIV monoinfected ที่รับยาชนิดอื่นๆ กับกลุ่มที่ 2 HIV monoinfected ที่รับยาชนิดจีพีโอเวียร์ พบว่า ไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแม้ว่าจะรับยาต่างชนิดกัน จากผลการทดลองพบว่า HIV specific CD8+T cell มีแนวโน้มลดลงในกลุ่ม HIV/HCV coinfectd ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของ Granzyme A ที่พบในปริมาณมากในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบี แม้ว่า Granzyme A, Granzyme B และ Perforin จะมีประโยชน์ต่อการกำจัดเซลล์ติดเชื้อ แต่การแสดงออกของ Granzyme A, Granzyme B และ Perforin ที่มากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อระบบภูมิคุ้มกันดังจะเห็นได้จากความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณ CD4+T cell count

### รายการอ้างอิง

1. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. สถานการณ์ผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทย ณ.วันที่ 31 ตุลาคม พ.ศ. 2557; 2014 [cited 07 Jan 2015]. Available from: <http://www.boe.moph.go.th/report.php?cat=19>.
2. GHO. HIV/AIDS World Health Organization; 2014 [cited 06 Jan 2015]. Available from: <http://www.who.int/gho/hiv/en/>.
3. Armstrong GL WA, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ2. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States 1999 through 2002. *Annal of Internal Medicine* 2006;144(10):705-14.
4. Koziel M, Peters M. Viral Hepatitis in HIV infection. *The New England Journal Medicine*. 2007;356(14):1445-54.
5. Mauss S, Rockstroh JK. HCV/HIV-coinfection-is there a state of the art after APRICOT and RIBAVIC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(4):615-8.
6. Chanbancherd P, Paris RM, Torugsa K, de Souza M, Khin Saw Aye M, Chitpong A, et al. High frequency of HIV-1 and hepatitis C co-infection among young Thai men: evidence for a changing pattern of HIV transmission in Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2003;34(3):580-2.
7. Sungkanuparph S, Vibhagool A, Manosuthi W, Kiertiburanakul S, Atamasirikul K, Aumkhyan A, et al. Prevalence of hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infection with human immunodeficiency virus in Thai patients: a tertiary-care-based study. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2004;87(11):1349-54.
8. Chung RT, Andersen J, Volberding P, Robbins GK, Liu T, Sherman KE, et al. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *The New England Journal Medicine*. 2004;351(5):451-9.
9. Weber R, Sabin CA, Friis-Moller N, Reiss P, El-Sadr WM, Kirk O, et al. Liver-related deaths in persons infected with the human immunodeficiency virus: the D:A:D study. *Archives of Internal Medicine*. 2006;166(15):1632-41.
10. Urbanus AT, van de Laar TJ, Stolte IG, Schinkel J, Heijman T, Coutinho RA, et al. Hepatitis C virus infections among HIV-infected men who have sex with men: an expanding epidemic. *Aids*. 2009;23(12):F1-7.

11. van de Laar T, Pybus O, Bruisten S, Brown D, Nelson M, Bhagani S, et al. Evidence of a large, international network of HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1609-17.
12. Rotman Y, Liang TJ. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. *Journal of virology*. 2009;83(15):7366-74.
13. กัณฐกมลากล ว. เชื้อเอชไอวีและภูมิคุ้มกันต้านเซลล์. 3 ed: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2014. 152 p.
14. รุจนวิศาล น, ชุณหสวัสดิกุล บ. ตั๊กอ็อกเสปไวรัสซี: สำนักพิมพ์รวมธรรม; 2001. 167 p.
15. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology*. 2005;41(5):1019-28.
16. Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R, Jr., Phair J, Visscher B, Munoz A, et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet*. 2002;360(9349):1921-6.
17. Chauvel O, Lacombe K, Bonnard P, Lascoux-Combe C, Molina JM, Mialhes P, et al. Risk factors for acute liver enzyme abnormalities in HIV-hepatitis B virus-coinfected patients on antiretroviral therapy. *Antiviral therapy*. 2007;12(7):1115-26.
18. Chang JJ, Wightman F, Bartholomeusz A, Ayres A, Kent SJ, Sasadeusz J, et al. Reduced hepatitis B virus (HBV)-specific CD4+ T-cell responses in human immunodeficiency virus type 1-HBV-coinfected individuals receiving HBV-active antiretroviral therapy. *Journal of virology*. 2005;79(5):3038-51.
19. Bonacini M, Louie S, Bzowej N, Wohl AR. Survival in patients with HIV infection and viral hepatitis B or C: a cohort study. *Aids*. 2004;18(15):2039-45.
20. Eskild A, Magnus P, Petersen G, Sohlberg C, Jensen F, Kittelsen P, et al. Hepatitis B antibodies in HIV-infected homosexual men are associated with more rapid progression to AIDS. *Aids*. 1992;6(6):571-4.
21. Konopnicki D, Mocroft A, de Wit S, Antunes F, Ledergerber B, Katlama C, et al. Hepatitis B and HIV: prevalence, AIDS progression, response to highly active antiretroviral therapy and increased mortality in the EuroSIDA cohort. *Aids*. 2005;19(6):593-601.
22. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Barbosa P, Trocha A, Johnson RP, et al. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral

- quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *Journal of immunology*. 1996;156(7):2616-23.
23. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell*. 1995;81(1):9-12.
  24. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(10):735-47.
  25. Onlamoon N, Sukapirom K, Polsrila K, Ammaranond P, Pattanapanyasat K. Alteration of CD8+ T cell effector diversity during HIV-1 infection with discordant normalization in effective antiretroviral therapy. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2012;82(1):35-42.
  26. Demers KR, Reuter MA, Betts MR. CD8(+) T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis. *Immunological reviews*. 2013;254(1):190-206.
  27. ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับโรคเอดส์: ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2015 [cited 8 Mar 2015]. Available from: [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_1\\_001c.asp?info\\_id=901#1](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=901#1).
  28. ALTMAN LK. Discoverers of AIDS and Cancer Viruses Win Nobel: The New York Times; 2008 [updated 7 October 2008; cited 7 Mar 2015]. Available from: <http://www.nytimes.com/2008/10/07/health/07nobel.html?pagewanted=all&r=0>.
  29. Shehu-Xhilaga M, Oelrichs R. HIV Management in Australasia a guide for clinical care Jennifer Hoy SL, Jeffrey J Post, Alan Street editor: Australasian Society for HIV Medicine (ASHM); 2009.
  30. Phanuphak P, Lochareernkul C, Panmuong W, Wilde H. A report of three cases of AIDS in Thailand. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand*. 1985;3(2):195-9.
  31. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(6):780-7.
  32. Chanbancherd P, Limpairojn N, Benenson M, Jugsudee A, Julananto P, Tienamporn P, et al. HIV-2 infection in Thailand. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand*. 2000;18(4):245-8.
  33. Strauss JH, Strauss EG. *Viruses and Human Disease*. Second Edition ed. Edition S, editor: Academic Press is an imprint of Elsevier; 2008. 468 p.

34. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine*. 2009;15(8):871-2.
35. Rosenberg ES, Brennan CA, Claessens C, Constantine NT, Murphy G, Owen SM, et al. M53-A Criteria for Laboratory Testing and Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection; Approved Guideline 2011.
36. LEARNER A. HIV and AIDS: The Structure and Life Cycle of HIV [Online Textbook]. 2015 [cited 19 Mar 2015]. Available from: <http://www.learner.org/courses/biology/archive/images/1926.html>.
37. Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*. 1987;156(1):171-6.
38. Shehu-Xhilaga M, Hill M, Marshall JA, Kappes J, Crowe SM, Mak J. The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *Journal of virology*. 2002;76(9):4331-40.
39. Xu K. *Viral Gene Therapy*. Singapore. 2011.
40. HIV sequence database 2015 [cited 01 July 2015]. Available from: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>.
41. Naif HM. Pathogenesis of HIV Infection. *Infectious disease reports*. 2013;5(Suppl 1):e6.
42. Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, et al. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*. 1999;286(5443):1353-7.
43. Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, et al. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *Journal of virology*. 2005;79(14):9217-27.
44. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. 2001;410(6831):974-9.
45. Gougeon ML, Colizzi V, Dalgleish A, Montagnier L. New concepts in AIDS pathogenesis. *AIDS research and human retroviruses*. 1993;9(3):287-9.
46. Gougeon ML, Montagnier L. Apoptosis in AIDS. *Science*. 1993;260(5112):1269-70.
47. Douek DC, Roederer M, Koup RA. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annual review of medicine*. 2009;60:471-84.

48. Ahr B, Robert-Hebmann V, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology*. 2004;1:12.
49. WHO. HIV/AIDS [Online]. 2014 [cited 20 Mar, 2015]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>.
50. งานจิตเวชโรงพยาบาลสมเด็จพระสังฆราชองค์ที่17. เอ็ดส์ มีอาการอย่างไร 2015 [cited 23 Mar 2015]. Available from: [http://somdej17.moph.go.th/department/mhd/index.php?option=com\\_content&view=article&id=36:2011-01-19-02-40-25&catid=11:2011-01-19-02-36-32&Itemid=46](http://somdej17.moph.go.th/department/mhd/index.php?option=com_content&view=article&id=36:2011-01-19-02-40-25&catid=11:2011-01-19-02-36-32&Itemid=46).
51. Phanuphak P. National Guidelines on HIV/AIDS Diagnosis and Treatment:Thailand 2010. September 2010. 480 p.
52. 3 ขั้นตอนง่ายๆ ในการตรวจเอชไอวี 2015 [cited 20 Mar 2015]. Available from: <http://www.adamslove.org/d.php?id=69>.
53. Francis F. Mandy, Janet K.A. Nicholson, J. Steven McDougal. Guidelines for Performing Single-Platform Absolute CD4+ T-Cell Determinations with CD45 Gating for Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus 2003 [31 Jul 2015]. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5202a1.htm>.
54. องค์การโรคติดต่อสัมพันธ์ ส, เลิศพิริยสุวัฒน์ ช, โสฬ์เลขา ร, สุขกุล อ. Thailand National Guidline on HIV/AIDS Treatment and Prevention 2014: กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข; 2014.
55. Lam L, Hubbard M. Laboratory Procedure Manual Trucount Method 2003 [31 Jul 2015]. Available from: [http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes\\_03\\_04/l03\\_c\\_met\\_CD4+\\_CD8+.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_03_04/l03_c_met_CD4+_CD8+.pdf).
56. Ford N, Meintjes G, Pozniak A, Bygrave H, Hill A, Peter T, et al. The future role of CD4 cell count for monitoring antiretroviral therapy. *The Lancet Infectious diseases*. 2015;15(2):241-7.
57. Puren A, Gerlach JL, Weigl BH, Kelso DM, Domingo GJ. Laboratory operations, specimen processing, and handling for viral load testing and surveillance. *The Journal of infectious diseases*. 2010;201 Suppl 1:S27-36.
58. Liu H, Su Y, Zhu L, Xing J, Wu J, Wang N. Effectiveness of ART and condom use for prevention of sexual HIV transmission in serodiscordant couples: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(11):e111175.
59. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(4):a007161.



60. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*. 1992;256(5065):1783-90.
61. Witvrouw M, Pannecouque C, Van Laethem K, Desmyter J, De Clercq E, Vandamme AM. Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV. *Aids*. 1999;13(12):1477-83.
62. WHO. Hepatitis [Online]. 2015 [cited 24 Mar 2015]. Available from: <http://who.int/topics/hepatitis/en/>.
63. Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *The Indian journal of medical research*. 2010;131:17-34.
64. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(7):1745-54.
65. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microbial & comparative genomics*. 2000;5(3):129-51.
66. Chevaliez S, Pawlotsky J-M. HCV Genome and Life Cycle. Tan SL, editor. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.
67. Lindenbach BD, Rice CM. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(10):688-700.
68. Danta M, Brown D, Bhagani S, Pybus OG, Sabin CA, Nelson M, et al. Recent epidemic of acute hepatitis C virus in HIV-positive men who have sex with men linked to high-risk sexual behaviours. *Aids*. 2007;21(8):983-91.
69. WHO. Hepatitis C [Online]. 2014 [cited 20 Mar 2015]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
70. Tanwandee T, Piratvisuth T, Phornphutkul K, Mairiang P, Permpikul P, Poovorawan Y. Risk factors of hepatitis C virus infection in blood donors in Thailand: a multicenter case-control study. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2006;89 Suppl 5:S79-83.
71. Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, et al. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet*. 2000;356(9244):1800-5.
72. Yacisin K, Maida I, Rios MJ, Soriano V, Nunez M. Hepatitis C virus coinfection does not affect CD4 restoration in HIV-infected patients after initiation of

- antiretroviral therapy. *AIDS research and human retroviruses*. 2008;24(7):935-40.
73. ศรีคำม่วน ม. *Viral Hepatitis รู้จริงรู้ชัด ไวรัสตับอักเสบซี*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไกล่หมอ; 2008.
  74. กระทรวงสาธารณสุข. *ไวรัสตับอักเสบ ซี* [Online]. 2015 [cited 19 Mar 2015]. Available from: [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_nih/a\\_nih\\_1\\_001c.asp?info\\_id=1237](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1237).
  75. แทนวันดี ท. *Conquering Chronic Hepatitis C; รายงานประชุมวิชาการ* [Online]. คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล 2010 [cited 19 Mar 2015]. Available from: <https://www.bangkokhospital.com/images/downloads/hcv%20forlipa.pdf>.
  76. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-74.
  77. Miriam J. Alter, Wendi L. Kuhnert, Lyn Finelli. Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus 2003 15 Mar 2015:[1-16 pp.]. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5203a1.htm>.
  78. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*. 2002;347(13):975-82.
  79. Hadziyannis SJ, Sette H, Jr., Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of Internal Medicine*. 2004;140(5):346-55.
  80. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958-65.
  81. Chakravarti D, Hong R. SET-ting the stage for life and death. *Cell*. 2003;112(5):589-91.
  82. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral research*. 2006;69(3):129-41.
  83. Kaech SM, Ahmed R. *Immunology*. CD8 T cells remember with a little help. *Science*. 2003;300(5617):263-5.

84. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of virology*. 1994;68(12):8056-63.
85. von Herrath MG, Yokoyama M, Dockter J, Oldstone MB, Whitton JL. CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *Journal of virology*. 1996;70(2):1072-9.
86. Park SH, Rehermann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014;40(1):13-24.
87. Schulze Zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, Kasprovicz V, Nolan BE, Streeck H, et al. Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(1):61-75.
88. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghayeb J, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*. 2003;302(5645):659-62.
89. Ly KN, Xing J, Klevens RM, Jiles RB, Ward JW, Holmberg SD. The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the United States between 1999 and 2007. *Annals of Internal Medicine*. 2012;156(4):271-8.
90. Miller MF, Haley C, Koziel MJ, Rowley CF. Impact of hepatitis C virus on immune restoration in HIV-infected patients who start highly active antiretroviral therapy: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41(5):713-20.
91. Flynn JK, Dore GJ, Matthews G, Hellard M, Yeung B, Rawlinson WD, et al. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific interferon-gamma responses in individuals with HIV who acquire HCV infection: correlation with CD4(+) T-cell counts. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(10):1568-76.
92. Kim AY, Lauer GM, Ouchi K, Addo MM, Lucas M, Schulze Zur Wiesch J, et al. The magnitude and breadth of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells depend on absolute CD4+ T-cell count in individuals coinfecting with HIV-1. *Blood*. 2005;105(3):1170-8.
93. Harcourt G, Gomperts E, Donfield S, Klenerman P. Diminished frequency of hepatitis C virus specific interferon gamma secreting CD4+ T cells in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus coinfecting patients. *Gut*. 2006;55(10):1484-7.

94. Capa L, Soriano V, Garcia-Samaniego J, Nunez M, Romero M, Cascajero A, et al. Influence of HCV genotype and co-infection with human immunodeficiency virus on CD4(+) and CD8(+) T-cell responses to hepatitis C virus. *Journal of medical virology*. 2007;79(5):503-10.
95. Dutoit V, Ciuffreda D, Comte D, Gonvers JJ, Pantaleo G. Differences in HCV-specific T cell responses between chronic HCV infection and HIV/HCV co-infection. *European journal of immunology*. 2005;35(12):3493-504.
96. Nunez M, Soriano V, Lopez M, Ballesteros C, Cascajero A, Gonzalez-Lahoz J, et al. Coinfection with hepatitis C virus increases lymphocyte apoptosis in HIV-infected patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;43(9):1209-12.
97. Korner C, Kramer B, Schulte D, Coenen M, Mauss S, Fatkenheuer G, et al. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4+ T-cells in HIV-positive patients. *Clinical science*. 2009;116(12):861-70.
98. Roe B, Coughlan S, Dean J, Lambert JS, Keating S, Norris S, et al. Phenotypic characterization of lymphocytes in HCV/HIV co-infected patients. *Viral immunology*. 2009;22(1):39-48.
99. Rempel H, Sun B, Calosing C, Abadjian L, Monto A, Pulliam L. Monocyte activation in HIV/HCV coinfection correlates with cognitive impairment. *PloS one*. 2013;8(2):e55776.
100. Vlahakis SR, Villasis-Keever A, Gomez TS, Bren GD, Paya CV. Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human hepatocytes via CXCR4. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(10):1455-60.
101. Balasubramanian A, Ganju RK, Groopman JE. Signal transducer and activator of transcription factor 1 mediates apoptosis induced by hepatitis C virus and HIV envelope proteins in hepatocytes. *The Journal of infectious diseases*. 2006;194(5):670-81.
102. Munshi N, Balasubramanian A, Koziel M, Ganju RK, Groopman JE. Hepatitis C and human immunodeficiency virus envelope proteins cooperatively induce hepatocytic apoptosis via an innocent bystander mechanism. *The Journal of infectious diseases*. 2003;188(8):1192-204.
103. Ferri C, Antonelli A, Mascia MT, Sebastiani M, Fallahi P, Ferrari D, et al. HCV-related autoimmune and neoplastic disorders: the HCV syndrome. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2007;39 Suppl 1:S13-21.

104. Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *The Journal of experimental medicine*. 2002;195(1):43-9.
105. Streeck H, Frahm N, Walker BD. The role of IFN- $\gamma$  Elispot assay in HIV vaccine research. *Nature Protocols*. 2009;4:461 - 9.
106. Hoffman TL. Counting Cells. In: Celis JE, ed. *Cell Biology. A Laboratory Handbook*. San Diego: Elsevier Academic Press. 2006. 21-4 p.
107. Neuman MG, Schneider M, Nanau RM, Parry C. HIV-Antiretroviral Therapy Induced Liver, Gastrointestinal, and Pancreatic Injury. *International journal of hepatology*. 2012;2012:1-23.
108. พงษ์วิชัย ศ. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2011.
109. Migueles SA, Connors M. Long-term nonprogressive disease among untreated HIV-infected individuals: clinical implications of understanding immune control of HIV. *Jama*. 2010;304(2):194-201.
110. Haridas V, McCloskey TW, Pahwa R, Pahwa S. Discordant expression of perforin and granzyme A in total and HIV-specific CD8 T lymphocytes of HIV infected children and adolescents. *Aids*. 2003;17(16):2313-22.
111. Goping IS, Barry M, Liston P, Sawchuk T, Constantinescu G, Michalak KM, et al. Granzyme B-induced apoptosis requires both direct caspase activation and relief of caspase inhibition. *Immunity*. 2003;18(3):355-65.
112. Vermijlen D, Froelich CJ, Luo D, Suarez-Huerta N, Robaye B, Wisse E. Perforin and granzyme B induce apoptosis in FasL-resistant colon carcinoma cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2001;50(4):212-7.
113. Pallikkuth S, Wanchu A, Bhatnagar A, Sachdeva RK, Sharma M. Human immunodeficiency virus (HIV) gag antigen-specific T-helper and granule-dependent CD8 T-cell activities in exposed but uninfected heterosexual partners of HIV type 1-infected individuals in North India. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2007;14(9):1196-202.
114. Matthews-Greer JM, Caldito GC, Adley SD, Willis R, Mire AC, Jamison RM, et al. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without human immunodeficiency virus. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2001;8(4):690-4.
115. Bailey J, Blankson JN, Wind-Rotolo M, Siliciano RF. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Current opinion in immunology*. 2004;16(4):470-6.

116. Marsden MD, Zack JA. Double trouble: HIV latency and CTL escape. *Cell host & microbe*. 2015;17(2):141-2.
117. Edwards BH, Bansal A, Sabbaj S, Bakari J, Mulligan MJ, Goepfert PA. Magnitude of functional CD8+ T-cell responses to the gag protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates inversely with viral load in plasma. *Journal of virology*. 2002;76(5):2298-305.
118. Jiao Y, Xie J, Li T, Han Y, Qiu Z, Zuo L, et al. Correlation between gag-specific CD8 T-cell responses, viral load, and CD4 count in HIV-1 infection is dependent on disease status. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 2006;42(3):263-8.



## ภาคผนวก

### 1. เอกสารรับรองโครงการวิจัย หมายเลขไออาร์บี 613/57



COA No. 277/2015

IRB No. 613/57

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1873 ถ.พระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 0-2256-4455 ต่อ 14, 15

#### เอกสารรับรองโครงการวิจัย

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ดำเนินการให้การรับรองโครงการวิจัยตามแนวทางหลักจริยธรรมการวิจัยในคนที่เป็นมาตรฐานสากลได้แก่ Declaration of Helsinki, The Belmont Report, CIOMS Guideline และ International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice หรือ ICH-GCP

ชื่อโครงการ : การตอบสนองของภูมิคุ้มกันชนิดที่เซลล์ต่อเชื้อไวรัสเอชไอวีในผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีร่วมกับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เลขที่โครงการวิจัย : -

ผู้วิจัยหลัก : นายบุตร แก้วบุญ

สังกัดหน่วยงาน : คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีทบทวน : คณะกรรมการเต็มชุด

รายงานความก้าวหน้า : ส่งรายงานความก้าวหน้าอย่างน้อย 1 ครั้ง/ปี หรือส่งรายงานฉบับสมบูรณ์หากดำเนินโครงการเสร็จสิ้นก่อน 1 ปี

เอกสารที่ได้รับการทบทวน :

1. โครงร่างการวิจัย Version 3.0 Dated 16 Apr 2015
2. โครงการวิจัยฉบับย่อ Version 3.0 Dated 16 Apr 2015
3. เอกสารข้อมูลคำอธิบายสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย Version 3.0 Dated 16 เมษายน 58
4. เอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย Version 2.0 Dated 18 Feb 2015
5. CURRICULUM VITAE
6. GCP Training
7. Case Report Form, CRF Version 2.0 Date 16 Feb 2015

ลงนาม .....  
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์อรรรณพ ใจสำราญ)  
รองประธานปฏิบัติหน้าที่แทนประธาน  
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

ลงนาม .....  
(รองศาสตราจารย์สุพิชา วิทย์เลิศปัญญา)  
กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการปฏิบัติหน้าที่แทนเลขานุการ  
คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

วันที่รับรอง : 30 เมษายน 2558

วันหมดอายุ : 29 เมษายน 2559

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

## 2. อาหารเลี้ยงเซลล์และบัฟเฟอร์

Wash Buffer for Flowcytometry	100 ml
Fetal Bovine Serum Heat inactivated (FBS)	2 ml
Dulbeco's Phosphate Buffer Saline (DPBS)	98 ml
Wash Media	100 ml
RPMI 1640	97 ml
FBS	2 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
กรองผ่าน filter ขนาด 0.2 $\mu\text{m}$	
Freeze Media	100 ml
RPMI 1640	69 ml
FBS	20 ml
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	10 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
กรองผ่าน filter ขนาด 0.2 $\mu\text{m}$	
Complete Media	100 ml
RPMI 1640	87 ml
Human Serum AB	10 ml
L-Glutamine	2 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
กรองผ่าน filter ขนาด 0.2 $\mu\text{m}$	



10% FBS Media	100 ml
RPMI 1640	87 ml
FBS	10 ml
L-Glutamine	2 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
กรองผ่าน filter ขนาด 0.2 $\mu$ m	
0.05% tween <sup>®</sup> 20 PBS Wash Buffer	10000 ml
DI water	10000 ml
Phosphate Buffer Saline (PBS)	98.8 g
Tween <sup>®</sup> 20	5 ml
PBS Wash Buffer	10000 ml
DI water	10000 ml
PBS	98.8 g
0.5% BSA-PBS Diluents	100 ml
DPBS	100 ml
Albumin Bovine (BSA)	0.5 g
0.05% tween <sup>®</sup> 20 PBS Diluents	100 ml
DPBS	100 ml
Tween <sup>®</sup> 20	50 $\mu$ l

### 3. HIV-1 Gag peptide

HIV-1 Gag peptide 122 peptide ใน DPBS ความเข้มข้น 20 µg/peptide/ml ความเข้มข้นของ DMSO 3.26%

Seq #	Sequence	Seq #	Sequence
1	MGARASVLSGGELDR	29	KKAQQAADTGHSNQ
2	ASVLSGGELDRWEKI	30	QAAADTGHSNQVSN
3	SGGELDRWEKIRLRP	31	DTGHSNQVSNYPIV
4	LDRWEKIRLRPGGKK	32	SNQVSNYPIVQNIQ
5	EKIRLRPGGKKKYKL	33	SNYPIVQNIQGQMV
6	LRPGGKKKYKLKHIV	34	PIVQNIQGQMVHQAI
7	GKKKYKLKHIVWASR	35	NIQGQMVHQAISPT
8	YKLKHIVWASRELER	36	QMVHQAISPTLNAW
9	HIVWASRELERFAVN	37	QAISPTLNAWKVV
10	ASRELERFAVNPGLL	38	PRTLNAWVKVVEEKA
11	LERFAVNPGLLETSE	39	NAWVKVVEEKAFSPE
12	AVNPGLLETSEGCRQ	40	KVVEEKAFSPEVIPM
13	GLLETSEGCRQILGQ	41	EKAFSPEVIPMFSAL
14	TSEGCRQILGQLQPS	42	SPEVIPMFSALSEGA
15	CRQILGQLQPSLQTG	43	IPMFSALSEGATPQD
16	LGQLQPSLQTGSEEL	44	SALSEGATPQDLNTM
17	LQPSLQTGSEELRSLY	45	EGATPQDLNTMLNTV
18	QTGSEELRSLYNTVA	46	PQDLNTMLNTVGGHQ
19	EELRSLYNTVATLYC	47	NTMLNTVGGHQAAMQ
20	SLYNTVATLYCVHQR	48	NTVGGHQAAMQMLKE
21	TVATLYCVHQRIEIK	49	GHQAAMQMLKETINE
22	LYCVHQRIEIKDTKE	50	AMQMLKETINEEAAE
23	HQRIEIKDTKEALDK	51	LKETINEEAAEWDRV
24	EIKDTKEALDKIEEE	52	INEEAAEWDRVHPVH
25	TKEALDKIEEEQNKS	53	AAEWDRVHPVHAGPI
26	LDKIEEEQNKSKKKA	54	DRVHPVHAGPIAPGQ
27	EEQNKSKKKAQQAA	55	PVHAGPIAPGQMREP
28	NKSKKKAQQAAADTG	56	GPIAPGQMREPRGSD

Seq #	Sequence	Seq #	Sequence
57	PGQMREPRGSDIAGT	90	GHKARVLAEAMSQVT
58	REPRGSDIAGTTSTL	91	RVLAEAMSQVTNSAT
59	GSDIAGTTSTLQEQI	92	EAMSQVTNSATIMMQ
60	AGTTSTLQEQIGWMT	93	QVTNSATIMMQRGNF
61	STLQEQIGWMTNPP	94	SATIMMQRGNFRNQR
62	EQIGWMTNPPPIVVG	95	MMQRGNFRNQRKIVK
63	WMTNPPPIVGEIYK	96	GNFRNQRKIVKCFNC
64	NPPPIVGEIYKRWII	97	NQRKIVKCFNCGKEG
65	PVGEIYKRWILGLN	98	IVKCFNCGKEGHTAR
66	IYKRWILGLNKIVR	99	FNCGKEGHTARNCRA
67	WILGLNKIVRMYSP	100	KEGHTARNCRAPRKK
68	GLNKIVRMYSPSIL	101	TARNCRAPRKKGCWK
69	IVRMYSPSILDIRQ	102	CRAPRKKGCWKCGKE
70	YSPTSILDIRQGPKE	103	RKKGCWKCGKEGHQM
71	SILDIRQGPKEFRD	104	CWKCGKEGHQMKDCT
72	IRQGPKEFRDYVDR	105	GKEGHQMKDCTERQA
73	PKEFRDYVDRFYKT	106	HQMKDCTERQANFLG
74	FRDYVDRFYKTLRAE	107	DCTERQANFLGKIWP
75	VDRFYKTLRAEQASQ	108	RQANFLGKIWPSYKG
76	YKTLRAEQASQEVKN	109	FLGKIWPSYKGRPGN
77	RAEQASQEVKNWMT	110	IWPSYKGRPGNFLQS
78	ASQEVKNWMTETLLV	111	YKGRPGNFLQSRPEP
79	VKNWMTETLLVQAN	112	PGNFLQSRPEPTAPP
80	MTETLLVQANPDCK	113	LQSRPEPTAPPEESF
81	LLVQANPDCKTILK	114	PEPTAPPEESFRSGV
82	NANPDCKTILKALGP	115	APPEESFRSGVETTT
83	DCKTILKALGPAATL	116	ESFRSGVETTTTPQK
84	ILKALGPAATLEEMM	117	SGVETTTTPQKQEPI
85	LGPAATLEEMMTACQ	118	TTTTPQKQEPIDKEL
86	ATLEEMMTACQVGG	119	PQKQEPIDKELYPLT
87	EMMTACQVGGPGHK	120	EPIDKELYPLTSLRS
88	ACQVGGPGHKARVL	121	KELYPLTSLRSLFGN
89	VGGPGHKARVLAEAM	122	PLTSLRSLFGNDPSSQ

#### 4. HIV-1 Env peptide

HIV-1 Env peptide 166 peptide ใน DPBS ความเข้มข้น 20 µg/peptide/ml ความเข้มข้นของ DMSO 3.26%

Seq #	Sequence	Seq #	Sequence
1	MRVKETQMTWPNLWK	29	QSLKPCVKLTPLCVT
2	ETQMTWPNLWKWGTL	30	PCVKLTPLCVTLNCT
3	TWPNLWKWGTLILGL	31	LTPLCVTLNCTNANV
4	LWKWGTLILGLVIIC	32	CVTLNCTNANVTNVK
5	GTLILGLVIICSASD	33	NCTNANVTNVKNITN
6	LGLVIICSASDNLWW	34	ANVTNVKNITNVPNI
7	IICSASDNLWVTVYY	35	NVKNITNVPNIIGNI
8	ASDNLWTVYYGVPV	36	ITNVPNIIGNITDEV
9	LWVTVYYGVPVWRDA	37	PNIIGNITDEVRNCS
10	VYYGVPVWRDADTTL	38	GNITDEVRNCSFNMT
11	VPVWRDADTTLFCAS	39	DEVRNCSFNMTTEL
12	RDADTTLFCASDAKA	40	NCSFNMTTEL
13	TTLFCASDAKAQETE	41	NMTTEL
14	CASDAKAQETEAHNV	42	ELRDKKQKVHALFYK
15	AKAQETEAHNVWATH	43	KKQKVHALFYKLDIV
16	ETAHNVWATHACVP	44	VHALFYKLDIVPIED
17	HNWATHACVPTDPN	45	FYKLDIVPIEDNTSS
18	ATHACVPTDPNPQEL	46	DIVPIEDNTSSSEYR
19	CVPTDPNPQELHLEN	47	IEDNTSSSEYRLINC
20	DPNPQELHLENTEN	48	TSSSEYRLINCNTSV
21	QELHLENTENFNMW	49	EYRLINCNTSVIKQA
22	LENTENFNMWKNNM	50	INCNTSVIKQACPKI
23	TENFNMWKNNMVEQM	51	TSVIKQACPKISFDP
24	NMWKNNMVEQMVEDV	52	KQACPKISFDPIPIH
25	NNMVEQMVEDVISLW	53	PKISFDPIPIHYCTP
26	EQMQEDVISLWDQSL	54	FDPIPIHYCTPAGYA
27	EDVISLWDQSLKPCV	55	PIHYCTPAGYAILKC
28	SLWDQSLKPCVKLTP	56	CTPAGYAILKCNDKN

Seq #	Sequence	Seq #	Sequence
57	GYAILKCNDKNFNGT	91	IFQPPSGGDLEITMH
58	LKCNDKNFNGTGPK	92	PSGGDLEITMHFFN
59	DKNFNGTGPKNVSS	93	DLEITMHFFNCRGEF
60	NGTGPKNVSSVQCT	94	TMHHFNCRGEFFYCN
61	PCKNVSSVQCTHGIK	95	FNCRGEFFYCNTRL
62	VSSVQCTHGIKPVVS	96	GEFFYCNTRLFNNT
63	QCTHGIKPVVSTQLL	97	YCNTTRLFNNTCMEN
64	GKPVVSTQLLLNGS	98	TRLFNNTCMENETME
65	VVSTQLLLNGSLAEE	99	NNTCMENETMEGCNG
66	QLLLNGSLAEEEEIII	100	MENETMEGCNGTII
67	NGSLAEEEEIIIRSEN	101	TMEGCNGTIIIPCKI
68	AEEEEIIIRSENLTNN	102	CNGTIIIPCKIKQII
69	IIIRSENLTNNAKTI	103	IILPCKIKQIINMWQ
70	SENLTNNAKTIIVHL	104	CKIKQIINMWQGAGQ
71	TNNAKTIIVHLNKS	105	QIINMWQGAGQAMYA
72	KTIIVHLNKSVEINC	106	MWQGAGQAMYAPPIS
73	VHLNKSVEINCTRPS	107	AGQAMYAPPISGRIN
74	KSVEINCTRPSNNTR	108	MYAPPISGRINCVSN
75	INCTRPSNNTRTSIN	109	PISGRINCVSNITGI
76	RPSNNTRTSINIGPG	110	RINCVSNITGILLTR
77	NTRTSINIGPGQVFY	111	VSNITGILLTRDGGL
78	SINIGPGQVFYRTGD	112	TGILLTRDGGLNNTN
79	GPGQVFYRTGDIIGD	113	LTRDGGLNNTNETFR
80	VFYRTGDIIGDIRKA	114	GGLNNTNETFRPGGG
81	TGDIIGDIRKAYCEI	115	NTNETFRPGGGNIKD
82	IGDIRKAYCEINGTK	116	TFRPGGGNIKDNWRI
83	RKAYCEINGTKWNEV	117	GGGNIKDNWRIELYK
84	CEINGTKWNEVLKKV	118	IKDNWRIELYKYKV
85	GTKWNEVLKKVTKKL	119	WRIELYKYKVQIEP
86	NEVLKKVTKKLKEHF	120	LYKYKVQIEPLGIA
87	KKVTKKLKEHFNNKT	121	KVQIEPLGIAPTRA
88	KKLKEHFNNKTIIFQ	122	IEPLGIAPTRAQNHV
89	EHFNNKTIIFQPPSG	123	GIAPTRAQNHVVQNE
90	NKTIIFQPPSGGDLE	124	TRAQNHVVQNEHQAV

Seq #	Sequence	Seq #	Sequence
125	NHWVQNEHQAVGIGA	148	NMTWMEWDREINNYT
126	QNEHQAVGIGALFLG	149	MEWDREINNYTSLIH
127	QAVGIGALFLGFLGA	150	REINNYTSLIHSLIE
128	IGALFLGFLGAAGST	151	NYTSLIHSLIEESQN
129	FLGFLGAAGSTMGAR	152	LIHSLIEESQNQQEK
130	LGAAGSTMGARSMTL	153	LIEESQNQQEKNEQE
131	GSTMGARSMTLTVQA	154	SNQQEKNEQEELLE
132	GARSMTLTVQARQLL	155	QEKNEQEELLELDKWA
133	MTLTVQARQLLSGIV	156	EQELLELDKWASLWN
134	VQARQLLSGIVQQQN	157	LELDKWASLWNWFNI
135	QLLSGIVQQQNLLR	158	KWASLWNWFNITNWL
136	GIVQQQNLLRAIEA	159	LWNWFNITNWLWYIK
137	QQNLLRAIEAQQHL	160	FNITNWLWYIKNRVR
138	LLRAIEAQQHLLQLT	161	NWLWYIKNRVRQGYS
142	WGIKQLQATWNASWS	162	YIKNRVRQGYSPLSF
143	QLQATWNASWSNKSL	163	RVRQGYSPLSFQTHL
144	TWNASWSNKSEQIW	164	GYSPLSFQTHLPTPR
145	SWSNKSEQIWNMT	165	LSFQTHLPTPRGPDR
146	KSLEQIWNMTWMEW	166	THLPTPRGPDRPEGI
147	QIWNMTWMEWDREI		

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายบุตร แก้วบุญ เกิดเมื่อวันที่ 11 เดือนพฤษภาคม พุทธศักราช 2522 ณ อำเภอหนอง  
กุงศรี จังหวัดกาฬสินธุ์ สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะ  
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี เมื่อวันที่ 07 เดือนมิถุนายน  
พุทธศักราช 2545 เข้าศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา  
วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีพุทธศักราช 2554

