

รายงานฉบับสมบูรณ์

การวิเคราะห์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีโดยทีเซลล์: การทดสอบที่ใช้วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันที่ได้
จากการกระตุ้นด้วยวัคซีนป้องกัน HIV

**Analysis of HIV suppression activity mediated by T-cell response: An assay to evaluate protective
immune response of HIV vaccine**

ผศ.นพ.ดร.ปกรัฐ หังสตุต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปี พ.ศ. 2556

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2556 ขอบุณภาควิชาจุลชีวะวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่ และเครื่องมือ และท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครที่ได้สังเกตเห็นความสำคัญและยินดีบริจาคเลือดเพื่อความสำเร็จของโครงการวิจัยนี้

การวิเคราะห์การยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีโดยทีเซลล์: การทดสอบที่ใช้วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันที่ได้จากการกระตุ้นด้วยวัคซีนป้องกัน HIV

Analysis of HIV suppression activity mediated by T-cell response: An assay to evaluate protective immune response of HIV vaccine

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2556 จำนวนเงิน 1,200,000 บาท (หนึ่งล้านสองแสนบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน

หัวหน้าโครงการวิจัย ผศ.นพ.ดร. ปกรณ์ หงส์สุด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Yada Tansiri, ^{*} Pokrath Hansasuta, ^{*}

“Division of Virology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama IV Rd, Bangkok 10330, Thailand.

Introduction and Objective: Among HIV infected donors, the natural history of HIV infection is different and HIV load is the one of factors resulting in the different clinical outcome. We have been characterized HIV infected donors into 2 groups: controllers (HIV loads < 2,000 copies/ml) and noncontrollers (HIV loads > 2,000 copies/ml). In our previous study, we found that controllers who naturally control HIV infection have the higher number of HIV-gag p24 specific T cells than noncontrollers significantly. Thus, we hypothesized that these polyfunctional T cells can effectively suppress HIV replication leading to the low level of HIV loads in controllers.

Methods: The functional quality of T cells was detected using intracellular cytokine staining assay. HIV isolates were isolated from HIV infected donors and then superinfected with autologous CD4+ T cells. The different functional quality of HIV-gag p24 specific T cell lines and bulk CD8+ T cells were used as effectors in their autologous HIV suppression assay. HIV suppression was assessed using HIV-gag p24 ELISA assay.

Results: In our study, controllers were significantly higher in the absolute number of full 5 functions, HIV-gag p24 specific T cells than noncontrollers. Moreover, *in vitro* HIV suppression assay has been shown that bulk CD8+ T cells from controllers can significantly suppress HIV replication when compared with noncontrollers. And, the HIV-gag p24 specific T cell line from controllers has the ability to suppress HIV replication in *in vitro* assay, effectively.

Conclusion: HIV-gag p24 specific T cell responses from controllers have the superior effect on the suppression of HIV replication *in vitro* study.

คำสำคัญ (Keywords)

- HIV
- T cells
- Suppression assay
- Protective immunity
- Controller

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	10
2. การทบทวนวรรณกรรม	12
3. ระเบียบวิธีวิจัย	12
4. ผลการวิจัย	19
5. อภิปรายและวิจารณ์ผล	74
6. สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	75
7. บรรณานุกรม	76

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง criteria ที่ใช้ในการรวบรวมผู้ติดเชื้อเอชไอวี	19
ตารางที่ 2 แสดงการจำแนกประเภทของผู้ติดเชื้อเอชไอวี	20
ตารางที่ 3 แสดง โดยแสดงค่า Median CD4 count และ Median plasma HIV loads ของ Elite controllers, Viraemic controllers, และ Noncontrollers	21
ตารางที่ 4 แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่มที่นำมาแยกเอชไอวีจาก PBMCs	25
ตารางที่ 5 แสดงผลของการแยกเอชไอวีจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม	25
ตารางที่ 6 แสดงการเตรียมสารสำหรับทำ PCR reaction	27
ตารางที่ 7 แสดง PCR conditions สำหรับการตรวจ CCR5 gene	28
ตารางที่ 8 แสดงจำนวนอาสาสมัครที่ได้รับการตรวจหา CCR5 gene ด้วย PCR	29
ตารางที่ 9 แสดงจำนวนอาสาสมัครที่ใช้ HIV supernatant มา propagation ต่อ	32
ตารางที่ 10 แสดง condition ที่เหมาะสมสำหรับ HIV superinfection หรือ HIV infection assay	42
ตารางที่ 11 แสดงกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดที่ทำการทดลอง HIV superinfection หรือ infection	43
ตารางที่ 12 แสดง HIV isolates และ HIV propagation ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด	43
ตารางที่ 13 แสดงกลุ่มอาสาสมัครที่ทำการทดลอง superinfection หรือ infection ด้วย HIV isolates	51
ตารางที่ 14 แสดงกลุ่มอาสาสมัครที่ทำการทดลองและผลการทดลอง superinfection หรือ infection ด้วย HIV isolates ใน HIV infected donors และ healthy donors	45
ตารางที่ 15 แสดงความเข้มข้นของ Standard HIV-gag p24 Ag	47
ตารางที่ 16 แสดงการเตรียม Streptavidin-peroxidase working solution	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 17 แสดงการเตรียม Substrate working solution	49
ตารางที่ 18 แสดงค่า OD ของ Standard HIV-gag p24 Ag	50
ตารางที่ 19 แสดงขั้นตอนการทำ HIV isolation และเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนโดยประมาณ	52
ตารางที่ 20 แสดงอาสาสมัครที่ทำการย้อมดู purity ของการแยก T cells ด้วย CD3 surface markers	55
ตารางที่ 21 แสดง % Purity ของ T cells ที่แยกจาก PBMC แล้วย้อม surface marker CD3	56
ตารางที่ 22 แสดงอาสาสมัครที่ทำการย้อมดู purity ของการแยก CD4+ T cells ออกจาก T cells ด้วยการย้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers	59
ตารางที่ 23 แสดง % Purity ของ CD4+ T cells ที่แยกจาก T cells แล้วย้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers	60
ตารางที่ 24 แสดง % Purity ของ CD8+ T cells ที่แยกจาก T cells แล้วย้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers	61
ตารางที่ 25 แสดง % Purity ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่แยกจาก T cells แล้วย้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers	62
ตารางที่ 26 แสดงการทำการทดลอง HIV suppression assay ด้วย Bulk CD8+ T cells	67

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 1 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีจากการแบ่งกลุ่มเป็น EC, VC และ NC ด้วยค่า HIV loads	20
รูปที่ 2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ CD4 count (Median CD4 count) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม	22
รูปที่ 3 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ plasma HIV loads (Median plasma HIV loads) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม	23
รูปที่ 4 กราฟแสดงผลของการแยกเอชไอวีจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม (%Success rate)	26
รูปที่ 5 ภาพแสดงการ Run gel electrophoresis ของ CCR5 gene detection	28
รูปที่ 6 กราฟแสดงการตรวจ CCR5 gene ของอาสาสมัคร	30
รูปที่ 7 กราฟแสดงผลของ HIV propagation จาก HIV supernatant	32
รูปที่ 8 กราฟแสดง % HIV-gag p24 positive CD4+ T cells ของ healthy donors ที่วัดได้จาก flow cytometry ของการ infection ด้วย HIV supernatant	36
รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณ HIV-gag p24 positive CD4+ T cells จากการ superinfection กับ PBMC ของ VC ด้วย HIV isolates ของ VC ด้วยการย้อม intracellular HIV-gag p24 Ag ภายในเซลล์	38
รูปที่ 10 กราฟแสดงปริมาณ HIV-gag p24 Ag จาก culture supernatant ที่วัดด้วย ELISA assay จากการ superinfection ด้วย HIV isolate จาก VC กับ PBMC ของ VC ที่ dilution ต่างกัน	40
รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณ HIV-gag p24 Ag จาก culture supernatant ที่วัดด้วย ELISA assay ของการ superinfection และ infection กับ CD4+ T cells ของ HIV infected donors และ healthy donors ด้วย HIV isolates จาก VC และ NC ที่ dilution 1:10	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
รูปที่ 12 กราฟแสดงผลการ superinfection และ infection ด้วย HIV supernatant ใน HIV-infected donors และ Healthy donors	46
รูปที่ 13 กราฟแสดง Standard curve ของ Standard HIV-gag p24 Ag	51
รูปที่ 14 กราฟแสดง % Purity ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่แยกจาก T cells แล้วข้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers	63
รูปที่ 15 ภาพแสดงการทำการทดลอง HIV suppression ด้วย Bulk CD8+ T cells	67
รูปที่ 16 กราฟแสดง % HIV suppression ของ controllers, noncontrollers และ healthy donors	68
รูปที่ 17 กราฟแสดง HIV suppression ด้วย HIV-specific T cell lines ของ controllers จากการวัด intracellular HIV-gag p24 Ag ของ CD4+ T cells	70
รูปที่ 18 กราฟแสดง HIV suppression ด้วย HIV-specific T cell lines ของ noncontrollers จากการวัด intracellular HIV-gag p24 Ag ของ CD4+ T cells	71
รูปที่ 19 กราฟแสดง % HIV suppression ด้วย HIV-specific T cell lines ของ controllers จากการวัด HIV-gag p24 Ag ใน culture supernatant ด้วย ELISA assay	73

1. บทนำ

HIV/AIDS เป็นปัญหาที่สำคัญของโลกรวมทั้งประเทศไทย ปัจจุบันมีผู้ป่วย HIV/AIDS ทั่วโลกมากกว่า 33 ล้านคน และในประเทศไทยประมาณ 800,000 ถึง 1,000,000 คน ถึงแม้มีความพยายามที่จะลดจำนวนผู้ติดเชื้อลงด้วยการรณรงค์การใช้ถุงยางอนามัย แต่พบว่าในกลุ่มเสี่ยงบางกลุ่มอัตราการติดเชื้อ ได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว [1] ถึงแม้ว่าการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral treatment, ART) ได้ผล เป็นอย่างดี แต่ผู้ป่วยต้องรับประทานยาดังกล่าวอย่างตรงเวลาจนตลอดชีวิต นอกจากนี้ ยายังมีผลข้างเคียง ทั้งที่เกิดขึ้นระยะสั้น และระยะยาวพอสมควร ดังนั้น แนวทางการรักษาผู้ติดเชื้อด้วย ART อาจไม่ใช่การ แก้ปัญหา HIV/AIDS แบบยั่งยืน

การพัฒนาวัคซีนที่ใช้ป้องกัน HIV/AIDS เป็นการแก้ปัญหาที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างว่าสามารถ ป้องกันและควบคุม HIV/AIDS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมี cost-benefit ที่ดี แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้มีความพยายามจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก และใช้เงินในการวิจัยมากมายมหาศาล การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ ป้องกันโรคนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จ โดยสาเหตุหลักมาจาก สายพันธุ์ที่หลากหลายของไวรัสชนิดนี้ และ การที่เรายังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกที่อาจใช้ในการป้องกัน หรือควบคุมการติดเชื้อ HIV

ถึงแม้ว่านักวิทยาศาสตร์ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าควรจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างไรจึงจะทำให้เกิดการ ป้องกันการติดเชื้อ HIV ได้ แต่มีหลักฐานในระดับหนึ่งที่ว่า T cells เป็นเซลล์หลักที่สามารถควบคุมการติดเชื้อ HIV ได้ หลักฐานนี้มาจากการศึกษาเปรียบเทียบผู้ติดเชื้อ HIV ที่มี clinical outcome ที่แตกต่างกัน โดยพบว่า ในผู้ติดเชื้อที่มี clinical outcome ที่ดี และมีระยะไม่มีอาการยาวนาน ปริมาณ CD4 T cell สูง และ ปริมาณ ไวรัสต่ำ (Longterm non-progressor, LTNP) จะมีปริมาณ และการตอบสนองของทีเซลล์สูงกว่าผู้ติดเชื้อที่มี typical clinical outcome (Typical progressor, TP) นอกจากนี้ ในการศึกษาแบบ cross-sectional โดยใช้ระดับ HIV set-point เป็นเกณฑ์ในการแบ่งผู้ติดเชื้อออกเป็นสามกลุ่มได้แก่ elite controller (EC) ซึ่งมี

HIV-RNA ต่ำกว่า 50 copies/ml, viraemic controller (VC) ซึ่งมี HIV-RNA อยู่ระหว่าง 51 ถึง 2,000 copies/ml และ typical progressor (TP) ซึ่งมีปริมาณ HIV-RNA มากกว่า 2,001 copies/ml พบว่า EC และ VC มีคุณภาพของ CD8+ T cells ดีกว่ากลุ่มที่เป็น typical progressor โดยในงานวิจัยตีพิมพ์ในระยะหลังนี้ชี้ให้เห็นว่า ทีเซลล์ที่สามารถหลั่ง cytokine ได้หลายชนิด มีคุณภาพดีกว่าทีเซลล์ที่หลั่งเฉพาะ gamma interferon (IFN γ) การวิเคราะห์ polyfunctional T cells ถึงแม้ว่าจะเป็นที่ยอมรับในระดับหนึ่งว่า อาจมีความสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ HIV จริง แต่หลักฐานที่นำมาประกอบแล้วแต่เป็นหลักฐานทางอ้อม (circumferential evidence) ที่แสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการมี polyfunctional T cells และปริมาณ HIV-RNA ที่ต่ำ แสดงยังไม่มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นผลโดยตรงในการยับยั้ง HIV replication

2. การทบทวนวรรณกรรม

HIV เป็นไวรัสใน Family Retroviridae มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวสองเส้น HIV มี glycoprotein spikes (gp160) ที่มีบทบาทสำคัญในการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส HIV สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ HIV-1 ซึ่งระบาดทั่วโลกและ HIV-2 ซึ่งมีการระบาดส่วนใหญ่อยู่ในทวีปแอฟริกา HIV-1 สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ Major group (M), Outlier group (O) และ Non-M, non-O group (N) การระบาดของ HIV-1 ในขณะนี้มาจาก group M เป็นส่วนใหญ่ นักวิทยาศาสตร์ได้แบ่งกลุ่ม HIV-1 ใน group M ตามความใกล้เคียงกันของ nucleotide sequence เรียกกลุ่มย่อยนี้ว่า subtype หรือ clade แต่ถ้า HIV-1 สายพันธุ์ใดที่มีลักษณะของไวรัสมากกว่าหนึ่ง subtype เรียกไวรัสสายพันธุ์นั้นว่าเป็น Circulating Recombinant Form (CRF) ตัวอย่างได้แก่ CRF01_AE ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดแพร่หลายมากที่สุดในประเทศไทย ซึ่งแต่เดิมถูกจัดอยู่ใน subtype E แต่ต่อมาพบว่าไวรัสชนิดนี้เป็นไวรัสลูกผสมระหว่าง subtype A และ subtype E จึงได้ตั้งชื่อใหม่เป็น CRF01_AE [2] เป็นต้น นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังพบว่ายังมี HIV ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ CRF01_AE และ subtype B ซึ่งได้ตั้งชื่อว่า CRF15_01B[3]

HIV-1 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100 ถึง 150 นาโนเมตร และมีขนาดของ genome ประมาณ 10 กิโลเบสซึ่งมี long-terminal repeats (LTRs) ขนาบอยู่สองข้าง HIV-1 มียีนหลักอยู่สามชนิด ได้แก่ *gagpol* และ *env* นอกจากนี้แล้ว HIV-1 ยังมียีนอีก 6 ชนิดที่เป็น regulatory และ accessory genes ได้แก่ *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef* และ *vpu*

ส่วนใหญ่ของโครงสร้างของ HIV-1 ได้มาจากยีน *gag* ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้น (precursor protein) ขนาดใหญ่ (pr55) หลังจากนั้นจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ protease ของไวรัสได้เป็นโปรตีนชนิดเล็กกลึง เช่น Matrix (MA, p17), Capsid (CA, p24) และ Nucleocapsid (NC, p7) matrix เป็นโปรตีนที่อยู่ผิวด้านในของ envelope และทำหน้าที่ในการชักนำให้เกิดการหุ้ม virion ของ HIV-1 ด้วย envelope ในกระบวนการเพิ่ม

จำนวนของไวรัสก่อนที่จะออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ matrix ยังมีส่วนร่วมในกระบวนการนำ viral preintegration complex เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์อีกด้วย ส่วน viral capsid (p24) นั้นเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของแกนกลาง (core) ของ HIV-1 ส่วน nucleocapsid (p7) เป็น RNA binding protein และมีหน้าที่ในการบรรจุ RNA ของไวรัสเข้าสู่ virion โปรตีน gag นับว่าเป็นโปรตีนที่สำคัญ มีหลักฐานว่าโปรตีนชนิดนี้สามารถชักนำให้เกิด protective immunity ส่วนเอนไซม์สร้างมาจากยีน *pol* ได้แก่ protease (p11), reverse transcriptase (RT)/RNase H (p66/p51) และ Integrase (p32) ส่วนยีน *env* นั้นสังเคราะห์โปรตีนขึ้นใน endoplasmic reticulum (ER) และผ่านกระบวนการ glycosylation ที่ ER และ golgi network ได้เป็นไกลโคโปรตีน gp160 ซึ่งมีขนาด 160 กิโลดาลตัน ซึ่งภายหลังจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ของเซลล์ได้เป็น 2 ส่วน ได้แก่ gp41 ซึ่งเป็น transmembrane subunit และ gp120 สำหรับยีนอีก 6 ชนิดนั้น มียีนอยู่สองชนิดที่มีความจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้แก่ *tat* และ *rev* แต่ยีนอีกสี่ชนิดนั้น (*vif*, *vpr*, *vpu* และ *nef*) ในบางกรณีไม่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัสในหลอดทดลอง ดังนั้นบางทีจึงเรียกว่า accessory genes

ในขณะที่การติดเชื้อ acute-resolving virus ใช้ neutralising antibody ในการป้องกันและควบคุมการติดเชื้อการติดเชื้อแบบ persistent infection และมี cell-to-cell transmission แบบ HIV มีปัญหาของการตอบสนองของแอนติบอดี โดยตำแหน่งที่ neutralising antibodies ต่อ HIV ไปจับมีอยู่สามตำแหน่ง ได้แก่ CD4-binding site ซึ่งอยู่บริเวณ V3-loop ของ gp120, co-receptor binding site และ gp41 ซึ่งทั้งสามตำแหน่งมีความหลากหลายของพันธุกรรมค่อนข้างมาก มี carbohydrate moiety ปกคลุม และเป็น unexposed domain ภายใน trimeric molecule นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์พบอีกว่าแอนติบอดีจากผู้ติดเชื้อ HIV ถึงแม้ว่าจะสามารถ neutralize สายพันธุ์ที่เป็น lab strain ได้ดี แต่ neutralize เชื้อ HIV ที่เป็น primary isolate ได้ไม่ดี [4-6] และแอนติบอดีส่วนใหญ่ที่สร้างขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ HIV เป็น non-neutralizing antibodies ซึ่งจับกับ virion debris [7] และยังพบอีกว่าแอนติบอดีดังกล่าวมีบทบาทน้อยมากในการควบคุมการติดเชื้อในระยะ primary infection ดังเห็นได้จากว่า การลดลงของปริมาณไวรัสในระยะ primary infection เกิดขึ้นก่อนมี

neutralising antibodies เสียอีก[7] และที่สำคัญ neutralising antibodies เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ค่อนข้างสูง มี neutralising antibodies อยู่เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถในการ neutralisation ข้ามสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และแอนติบอดีที่ออกฤทธิ์กว้างเหล่านี้เมื่อวิเคราะห์โครงสร้าง crystal structure แล้วพบว่ามิลักษณะที่ค่อนข้าง unique และ usual ทำให้เกิดปัญหาว่าจะพัฒนา immunogen อย่างไรเพื่อให้ได้แอนติบอดีที่มีลักษณะเฉพาะแบบนี้

นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่เชื่อว่าภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง cytotoxic T-lymphocyte (CTL) หรือ CD8+ T cells มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ HIV โดยมีหลักฐานว่าในระยะ primary infection นั้น ปริมาณไวรัสในเลือดลดลงเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ CTL [8] ซึ่งเป็นหลักฐานว่า CTL สามารถควบคุมการติดเชื้อ HIV อย่างน้อยที่สุดในช่วงแรกของการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีความสัมพันธ์เชิงผกผันระหว่างปริมาณ HIV ในเลือด และจำนวน HIV-specific T cells ในระยะ chronic infection [9] ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อวิเคราะห์การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีการดำเนินโรครัด (Long-term non progressor) จะพบว่า การตอบสนองของ CTL ต่อโปรตีน gag ของ HIV มีบทบาทสำคัญที่ทำให้ผู้ติดเชื้อในกลุ่มนี้มีการดำเนินโรครัดดีกว่าคนทั่วไป [10] ไม่เพียงแต่หลักฐานในผู้ที่ติดเชื้อเท่านั้น CTL ยังมีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อผู้ที่สัมผัสเชื้อแต่ไม่ติด (Highly-exposed persistently seronegative persons, HEPS) อีกด้วย[11-14]

ในการวิเคราะห์การตอบสนองของ CTL นั้น ช่วงแรกของการศึกษาใช้วิธี Chromium-release cytotoxic killing assay ซึ่งเป็น in vitro /semi-quantitative assay และมีความเสี่ยงจากสาร radioactive ต่อมา มีการพัฒนา ELISpot ซึ่งตรวจสอบการหลั่ง IFN γ จาก T cells ที่ถูกกระตุ้นโดย specific peptide เทคนิคนี้ทำได้ง่าย สะดวก ทำได้ทีละหลายๆ (high throughput) ใกล้เคียงกับสิ่งที่เกิดในร่างกายเพราะเป็น ex vivo assay ตลอดจนเป็น quantitative และไม่มีสารรังสีอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยเร็วๆนี้ได้แสดงให้เห็นว่า สำหรับการตอบสนองต่อ HIV นั้น ถ้าวิเคราะห์การหลั่ง IFN γ แต่เพียงอย่างเดียวจะไม่สัมพันธ์กับ

การควบคุม HIV หรืออาจกล่าวได้ว่า การวิเคราะห์ IFN γ monofunctional T cells ไม่สามารถบอกได้ว่า การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นนั้น เป็น protective immunity หรือไม่ ในระยะต่อมา ได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ cytokines หลายชนิดพร้อมกัน (simultaneous analysis of multiple intracellular cytokines) และพบว่า การวิเคราะห์ 'polyfunctionality' ในลักษณะนี้ สัมพันธ์กับการควบคุมปริมาณ HIV ปัญหาของการทดสอบวิธีนี้ได้แก่ การ standardization เครื่องมือที่ (multicolour flow cytometer) ต้องอาศัยความชำนาญขั้นสูง และไม่ได้แสดงถึงผลการควบคุม HIV replication โดยตรง คณะผู้วิจัยจึงเสนอการพัฒนาเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ความสามารถในการควบคุม HIV replication โดยตรง และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่ทันสมัยมากนัก ผู้วิจัยหวังว่าหลังจากได้ optimisation แล้ว เทคนิคนี้จะเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษา correlates to protective immunity และอาจใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคเอดส์ในอนาคต

3. ระเบียบวิธีวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อาสาสมัครคนปกติ 10 คน
2. อาสาสมัครติดเชื้อ HIV 5 คน โดยเป็น TP 3 คน และ VC 2 คน
3. การเก็บตัวอย่าง

เจาะเลือดรวม 50 ซีซี โดยใช้ EDTA หรือ ACD (ในกรณีที่แยกเพาะเชื้อ HIV) เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวและแยก PBMC โดยนำ blood มาเจือจางด้วย RPMI ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 หลังจากนั้นนำไปแยก PBMC โดยใช้วิธี Ficoll-hypaque density-gradient centrifugation ที่ 25 องศาเซลเซียส นำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย Trypan blue และนับโดยกล้องจุลทรรศน์

4. การแยกเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวน HIV isolates

นำ PBMC ของผู้ติดเชื้อ HIV (PBMC HIV) $10\text{-}15 \times 10^6$ cells (need optimization) มา depleted CD8+ T cells ด้วย Dynal® magnetic beads แล้วนำ CD8-depleted PBMC HIV ไป co-culture กับ PHA-activated CD8-depleted PBMC donor (approximately 5×10^6 cells-need optimization) ใน 8 ml R10/IL2 medium ที่มี polybrene, ciprofloxacin และ Penicillin/streptomycin ทั้งไว้ใน 37C/CO2 incubator 7 วัน เมื่อครบ 7 วันเอา supernatant ออกมา 2/3 และตรวจหาไวรัสโดย p24 antigen assay และ PCR หลังจากนั้นเติม

PHA-activated CD8-depleted PBMCdonor ลงไปใหม่แล้วเลี้ยงให้ครบ 7 วันอีกครั้ง ทำแบบนี้ 4 ถึง 5 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะได้ปริมาณไวรัสมากพอ

เมื่อได้ isolated virus แล้ว หลังจากนั้นนำมาเพิ่มจำนวน โดย นำ supernatant ที่มีไวรัสมา 1 ml และใส่ 5×10^6 PHA-activated CD8-depleted PBMCdonor in R10/IL2 medium ให้ได้ 5 ml และเลี้ยงที่ 37C เป็นเวลา 7 วัน เก็บ supernatant 3 ml เพื่อวิเคราะห์ไวรัส และเติม PBMCdonor แล้วเลี้ยงต่อจนครบ 7 วัน ทำแบบนี้ 4-5 cycles แล้วจึงไปวิเคราะห์ TCID50

การวิเคราะห์ TCID50 ทำโดยเจือจาง 5 เท่า (5-fold dilution) supernatant ให้ได้ทั้งสิ้น 8 dilutions ในแต่ละ dilution เติม PHA-activated CD8-depleted PBMCdonor 100,000 cells และเพื่อความแม่นยำทำเป็น quadruplicate หลังจากนั้น incubate 37C/CO2 เป็นเวลา 7 วันแล้วนำ supernatant มาตรวจ p24 antigen และเติม PBMCdonor และทำแบบนี้ 2 cycles แล้วคำนวณ TCID50 โดยอาศัยสูตร

$$-\text{Log TCID50 endpoint} = -\log a - [(b-0.5) \times \log c]$$

a = lowest virus dilution

b = sum of the percent p24-positive culture at each dilution

c = dilution factor

5. HIV (replication) suppression by T cells (ต้องการ extensive optimization)

นำ PBMC ของอาสาสมัครจำนวน 10 คนที่ติดเชื้อ HIV มาคัดเลือก T cells โดยใช้เทคนิค untouched CD3+ T cells หลังจากนั้นทำ CD4+ T cells positive selection โดย Mac beads และเก็บ CD8+ T cell fraction เอาไว้กระตุ้น CD4+ T cells ด้วย PHA 3 วัน แล้วนำไป superinfect ด้วยไวรัสที่ isolate มาได้แล้ว co-culture กับ CD8+ T cells (โดยใช้ E:T ratio หลาย ratio) และวัด p24 antigen ใน supernatant ที่ Day 0, 3, 5, 7 และ 10

6. การทดสอบเปรียบเทียบ HIV replication suppression by bulk CD8+T cells ในอาสาสมัคร TP

และ VC

Screen p24 peptides ในอาสาสมัครทั้งหมดด้วย ELISpot assays โดยกระตุ้นด้วย p24 overlapping peptides (OLP) เพื่อประเมินการตอบสนองผ่าน T cells ต่อ p24 antigen ใช้ protocol ที่ optimized แล้วจาก 2.5 แล้วเปรียบเทียบการ suppress HIV replication ของ bulk CD8+ T cells ของกลุ่ม TP กับกลุ่ม VC

4. ผลการวิจัย

1) การรวบรวม HIV-infected individuals

ผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีการดำเนินโรคที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำการรวบรวมผู้ติดเชื้อเอชไอวีด้วย criteria ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดง criteria ที่ใช้ในการรวบรวมผู้ติดเชื้อเอชไอวี

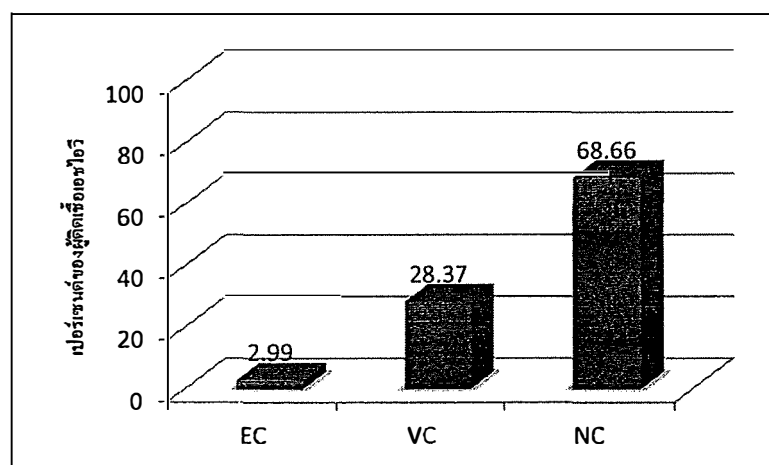
Inclusion criteria	Exclusion criteria
Anti-HIV antibody positive	Anti-HIV antibody negative
ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวีมากกว่า 1 ปี	ได้รับการรักษาด้วยยาค้านเอชไอวี
ค่าระดับ CD4 count มากกว่า 350 cells/ul 2 ครั้งติดต่อกัน	ค่าระดับ CD4 count น้อยกว่า 350 cells/ul
ไม่มีอาการของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี	มีอาการของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี
อยู่ในระยะเรื้อรังของการติดเชื้อเอชไอวี	ไม่อยู่ในระยะเรื้อรังของการติดเชื้อเอชไอวี

จากนั้นจะทำการแบ่งประเภทของผู้ติดเชื้อเอชไอวีออกเป็นสามประเภทดังตาราง

ตารางที่ 2 แสดงการจำแนกประเภทของผู้ติดเชื้อเอชไอวี

Donors	CD4 count (cells/ul)	HIV loads (copies/ml)
Elite controllers	> 350	< 50
Viraemic controllers	> 350	< 2000
Noncontrollers	> 350	> 2000

กราฟที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีจากการแบ่งกลุ่มเป็น EC, VC และ NC ด้วยค่า HIV loads



ผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 67 คน แบ่งเป็น Elite controllers, Viraemic controllers, และ Noncontrollers โดยแสดงค่า Median CD4 count และ Median plasma HIV loads ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่มดังนี้

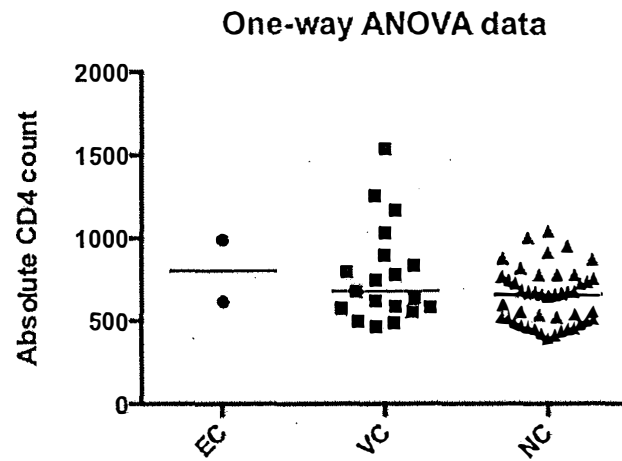
ตารางที่ 3 แสดงโดยแสดงค่า Median CD4 count และ Median plasma HIV loads ของ Elite controllers,

Viraemic controllers, และ Noncontrollers

Donors	จำนวนผู้ติด เชื้อเอชไอวี	CD4 count (cells/ul)	HIV loads (copies/ml)
Elite controllers (EC)	2	803 (615-990)	30 (20-40)
Viraemic controllers (VC)	19	681 (468-1540)	682 (96-2080)
Noncontrollers (NC)	46	661.5 (403-1540)	17525.5 (2472-446037)

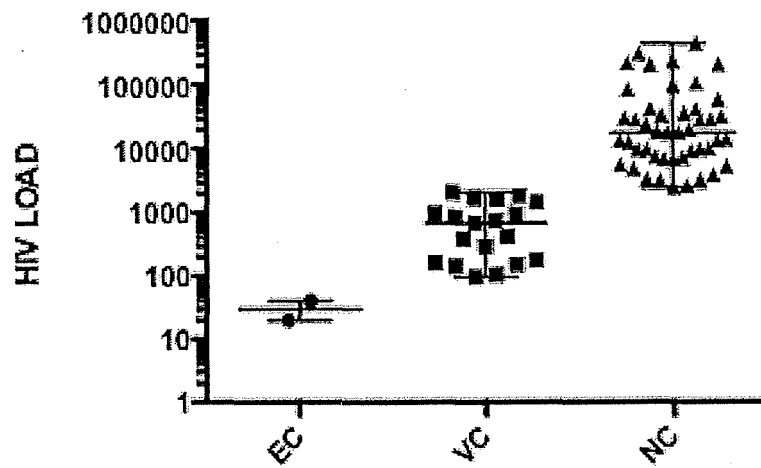
ผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 67 คน มีค่าเฉลี่ยของระดับ CD4 count (Median CD4 count) คือ 664 cells/ul โดยมีค่าระดับ CD4 count (Range of CD4 count) ตั้งแต่ 403 ถึง 1,540 cells/ul และมีค่าเฉลี่ยของระดับเอชไอวีในพลาสมา (Median plasma HIV loads) คือ 7,352 copies/ml โดยมีค่าระดับ HIV loads (Range of plasma HIV loads) ตั้งแต่ 20-446,037 copies/ml

รูปที่ 2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ CD4 count (Median CD4 count) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม



จากกราฟพบว่า median CD4 count ของทั้ง EC, VC และ NC ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่า median CD4 count ของ EC, VC และ NC คือ 803, 681 และ 661.5 cells/ul ตามลำดับ

รูปที่ 3 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับ plasma HIV loads (Median plasma HIV loads) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม



พบว่าค่าเฉลี่ยระดับ HIV loads ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งสามกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดยค่า median HIV loads ของ EC, VC และ NC คือ 30, 682 และ 17,525.5 copies/ml ตามลำดับ

2) การแยกเชื้อเอชไอวีจากผู้ติดเชื้อเอชไอวี (HIV isolation)

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม PBMC ของ Healthy donors ใน IF medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS)
2. Culture PBMC ใน PHA medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS, 5 ug/ml Ciprofloxin and 1ug/ml PHA)
3. Incubate 37 C, 5% CO₂, 2-3 days
4. เตรียม PHA stimulated PBMC ใน IL2 medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS, 5 ug/ml Polybrene and 10 U/ml IL2)
5. เตรียม PHA stimulated PBMC 5 million per ml ใน IL2 medium
6. Culture PHA stimulated PBMC และ 1-3 million PBMC ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี
7. Incubate ที่ 37 C ใน shaking incubator 1 ชั่วโมง
8. Resuspend 1 million per ml ใน IL2 medium 7 วัน
9. เก็บ supernatant 75 ul และเติม 0.2% vol/vol Triton x-100
10. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
11. วัด HIV-gag p24 Ag ด้วย ELISA assay
12. Remove 2 ใน 3 ของ supernatant
13. เติม 5 million PHA-stimulated PBMC
14. เก็บ supernatant ทุก 7 วัน

ผลการทดลอง

ผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมดจำนวน 29 คน ที่ทำการแยกเอชไอวีจาก PBMCs มีดังนี้

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่มที่นำมาแยกเอชไอวีจาก PBMCs

Donors	EC	VC	NC	HAART
N=29	2	9	16	2

ตารางที่ 5 แสดงผลของการแยกเอชไอวีจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม

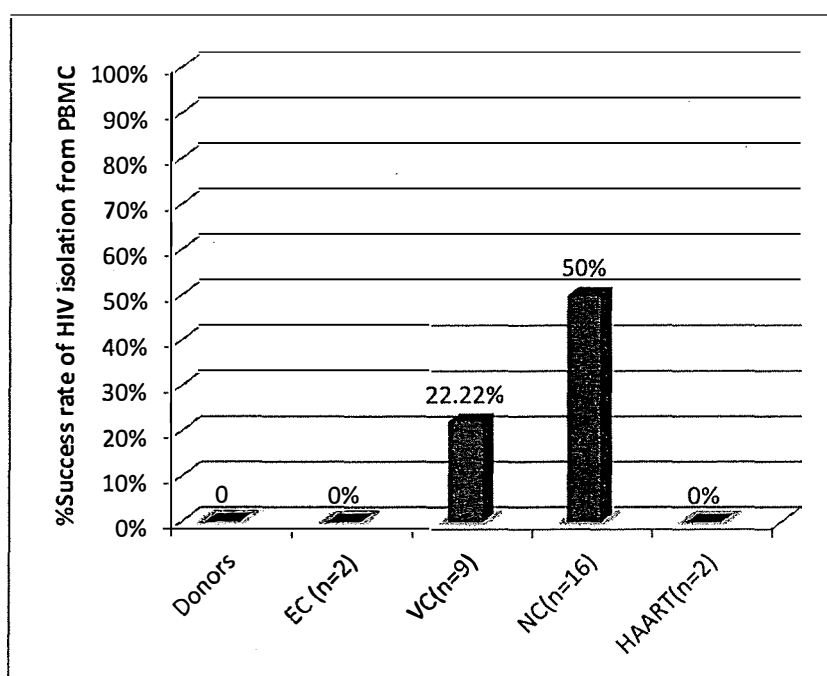
Donors	EC (n=2)		VC(n=9)		NC(n=16)		HAART(n=2)	
	+	-	+	-	+	-	+	-
HIV isolation	0/2	2/2	2/9	7/9	8/16	8/16	0/2	2/2
%Success rate	0%		22.22%		50%		0%	

+ หมายถึง สามารถแยกเอชไอวีจาก PBMC ได้จากการวัดผลด้วย ELISA assay

- หมายถึง ไม่สามารถแยกเอชไอวีจาก PBMC ได้จากการวัดผลด้วย ELISA assay

การ Isolation เอชไอวีจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 29 คน โดยประกอบด้วย EC จำนวน 2 คน VC จำนวน 9 คน NC จำนวน 16 คน และผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส 2 คน พบว่าการแยกเชื้อเอชไอวีสามารถแยกได้จากผู้ติดเชื้อ NC ได้ดีที่สุด และสามารถแยกได้ดีมากกว่าใน VC ซึ่งผู้ติดเชื้อเอชไอวี EC และผู้ที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสไม่สามารถแยกเชื้อเอชไอวีจาก PBMCs ได้

รูปที่ 4 กราฟแสดงผลของการแยกเอชไอวีจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละกลุ่ม (%Success rate)



จากผลการทดลอง HIV isolation พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีบางคนไม่สามารถแยกเชื้อเอชไอวี จาก PBMC ได้ ซึ่งอาจเป็นผลของการไม่มี CCR5 ที่เป็น coreceptor ในการเข้าสู่เซลล์ของเอชไอวี ดังนั้นจึงทำการตรวจหา CCR5 gene จาก PBMC

3) CCR5 detection

CCR5 คือ coreceptor ของ HIV ในการเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจก่อนทำการทดลอง

ขั้นตอนการทดลอง

1. แยก PBMC จาก EDTA blood
2. สกัด DNA จาก PBMC
3. ทำ PCR reaction เพื่อหาตำแหน่งที่หายไป 32 nucleotide บน CCR5 gene โดย CCR5 primer (5-GATAGGTACCTGGCTGTCGTCCAT-3 and 5-ACCAGCCCCAAGATGACTATCT-3)

ตารางที่ 6 แสดงการเตรียมสารสำหรับทำ PCR reaction

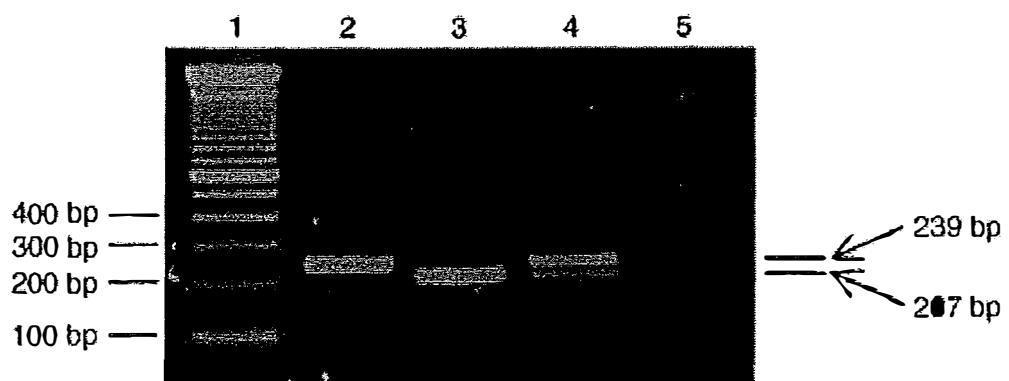
Reagents	Amount (ul)
10x buffer	5
dNTP	2
CCR5 sense primer	1
CCR5 antisense primer	1
DNA polymerase	0.2
Rnase-free-water	35.8
DNA	5
<u>Total volume</u>	50

ตารางที่ 7 แสดง PCR conditions สำหรับการตรวจ CCR5 gene

Steps	Temperature (C)	Time	No. of cycles
1	95	5 min	1
2	95	5 sec	35
	55	10 sec	
	72	1 min	
3	72	2 min	1
4	4	Hold	1

4. Run gel electrophoresis ด้วย 2% agarose gel
5. Wild-type CCR5 จะมีขนาด 239 bp และ CCR5 deletion 32 bp จะมีขนาด 207 bp

รูปที่ 5 ภาพแสดงการ Run gel electrophoresis ของ CCR5 gene detection

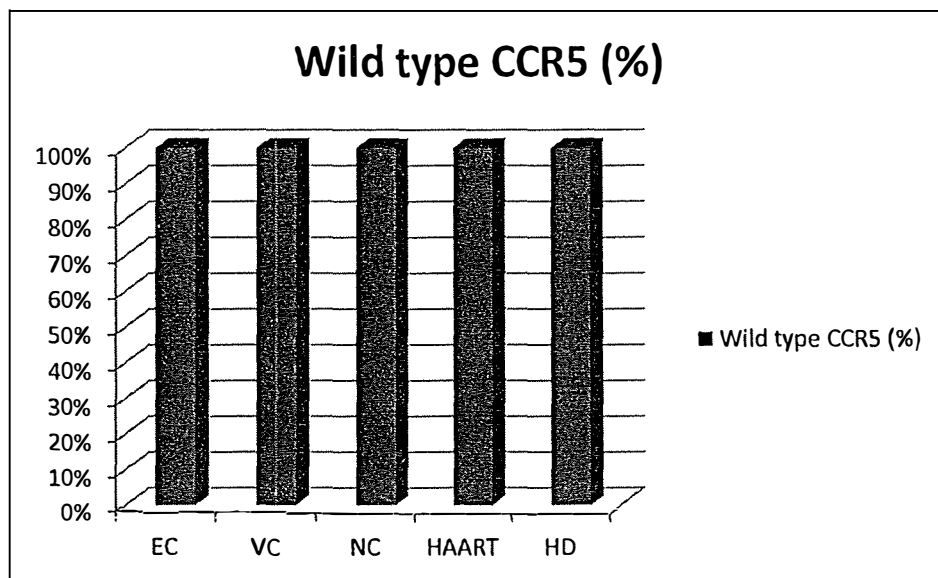


ตารางที่ 8 แสดงจำนวนอาสาสมัครที่ได้รับการตรวจหา CCR5 gene ด้วย PCR

Donor	EC		VC		NC		HAART		HD	
	WT	Del	WT	Del	WT	Del	WT	Del	WT	Del
Donors (n=73)	2		16		40		3		15	
CCR5 detection	2	0	16	0	40	0	3	0	15	0
Wild type CCR5 (%)	100%		100%		100%		100%		100%	

จากการตรวจหาการหายไปของ 32 basepairs บน CCR5 gene ที่มีผลต่อการเข้าสู่เซลล์ ของเอชไอวี พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีทุกคนมี CCR5 gene เป็นแบบ wild type ทั้งหมด

รูปที่ 6 กราฟแสดงการตรวจ CCR5 gene ของอาสาสมัคร



จากการแยกเชื้อเอชไอวีจาก PBMC ได้แล้ว จะต้องทำการเพิ่มปริมาณของเชื้อเอชไอวีเพื่อให้เพียงพอ ในการทำการทดลอง (HIV propagation) ซึ่ง HIV supernatant ที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้ง VC และ NC จะถูกนำมาเพิ่มปริมาณเพื่อให้มีปริมาณมากพอสำหรับการทดลองโดยนำ HIV supernatant จาก VC จำนวน 2 คน และจาก NC จำนวน 3 คนมา propagation ต่อ และผลการทำ HIV propagation แสดงดังต่อไปนี้

4) HIV propagation

ขั้นตอนการทดลอง

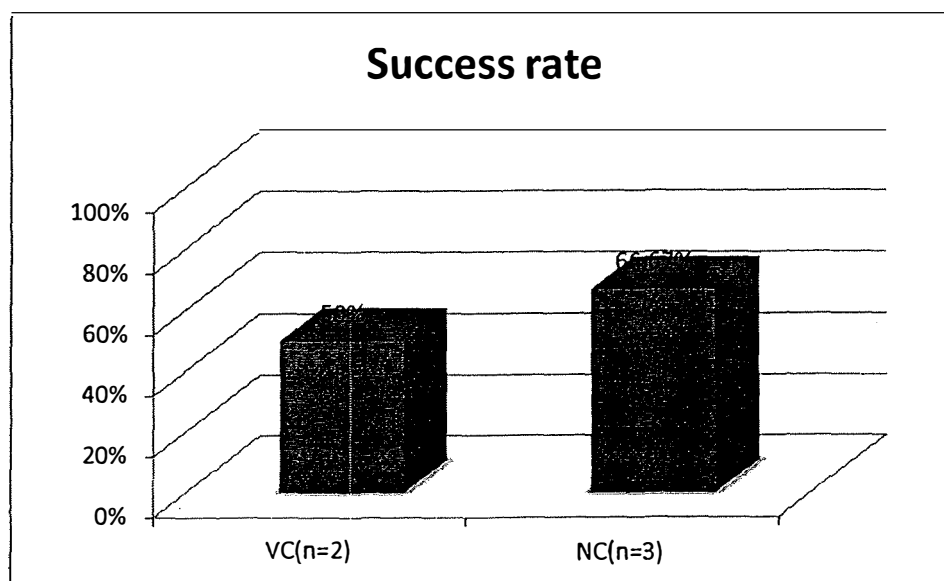
1. เตรียม PBMC ของ Healthy donors ใน IF medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS)
2. Culture PBMC ใน PHA medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS, 5 ug/ml Ciprofloxin and 1ug/ml PHA)
3. Incubate 37 C, 5% CO₂, 2-3 days
4. เตรียม PHA stimulated PBMC ใน IL2 medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS, 5 ug/ml Polybrene and 10 U/ml IL2)
5. เตรียม PHA stimulated PBMC 5 million per ml ใน IL2 medium
6. Culture PHA stimulated PBMC และ 1 ml HIV supernatant
7. Incubate ที่ 37 C ใน shaking incubator 1 ชั่วโมง
8. Resuspend 1 million per ml ใน IL2 medium 7 วัน
9. เก็บ supernatant 75 ul และเติม 0.2% vol/vol Triton x-100
10. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
11. วัด HIV-gag p24 Ag ด้วย ELISA assay
12. Remove 2 ใน 3 ของ supernatant
13. เติม 5 million PHA-stimulated PBMC
14. เก็บ supernatant ทุก 7 วัน

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนอาสาสมัครที่ใช้ HIV supernatant มา propagation ต่อ

Donors	VC (n=2)		NC (n=3)	
	+	-	+	-
HIV propagation	1/2	1/2	2/3	1/3
%Success rate	50%		66.67%	

จากการ propagation เพื่อเพิ่มจำนวนเอชไอวีให้มากเพียงพอต่อการทำการทดลองต่อไป พบว่า บาง HIV supernatant เท่านั้นที่สามารถ propagation ได้ โดยทั้ง VC และ NC สามารถ propagation ได้พอกัน

รูปที่ 7 กราฟแสดงผลของ HIV propagation จาก HIV supernatant



จากนั้นต้องทำการวัดปริมาณของ HIV supernatant ก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

5) การหาค่า HIV titer ใน HIV supernatant

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม PBMC ของ Healthy donors ใน IF medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS)
2. Culture PBMC ใน PHA medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS, 5 ug/ml Ciprofloxin and 1ug/ml PHA)
3. Incubate 37 C, 5% CO₂, 2-3 days
4. เตรียม PHA stimulated PBMC ใน IL2 medium (IMDM supplement with 10% vol/vol FBS, 5 ug/ml Polybrene and 10 U/ml IL2)
5. เตรียม PHA stimulated PBMC 1 million per ml ใน IL2 medium
6. เตรียม HIV supernatant เป็น 10-fold serial dilution
7. ใส่ 100 ul PHA-stimulated PBMC ใน 96-well plate
8. ใส่ 25 ul ของ diluted HIV supernatant
9. Incubate ที่ 37 C 5% CO₂ เป็นเวลา 7 วัน
10. Collect 50 ul HIV supernatant
11. เติม 50 ul 0.2% vol/vol Triton x-100
12. Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
13. วัด HIV-gag p24 Ag ด้วย ELISA assay
14. คำนวณหาค่า TCID 50

สูตรการคำนวณหาค่า TCID₅₀

$$-\log \text{TCID}_{50} \text{ end point} = -\log a - [(b - 0.5) \times \log c]$$

a คือ ค่าของ dilution ที่ต่ำสุดที่ใช้ในการทดลอง

b คือ ค่าผลรวมของเปอร์เซ็นต์ที่ culture ตรวจพบผลบวกของ HIV-gag p24 Ag ด้วย ELISA assay ที่แต่ละ dilution

c คือ dilution factor

เมื่อได้ค่า TCID₅₀ จะใช้เพื่อบอกปริมาณของ HIV supernatant ซึ่งการเลือกใช้ปริมาณ เอชไอวีจาก HIV supernatant เพื่อนำไปใช้ superinfection หรือ infection ในอาสาสมัครที่ติด และไม่ติดเชื้อเอชไอวี ตามลำดับ จำเป็นต้องทำการทดลองต่อไป

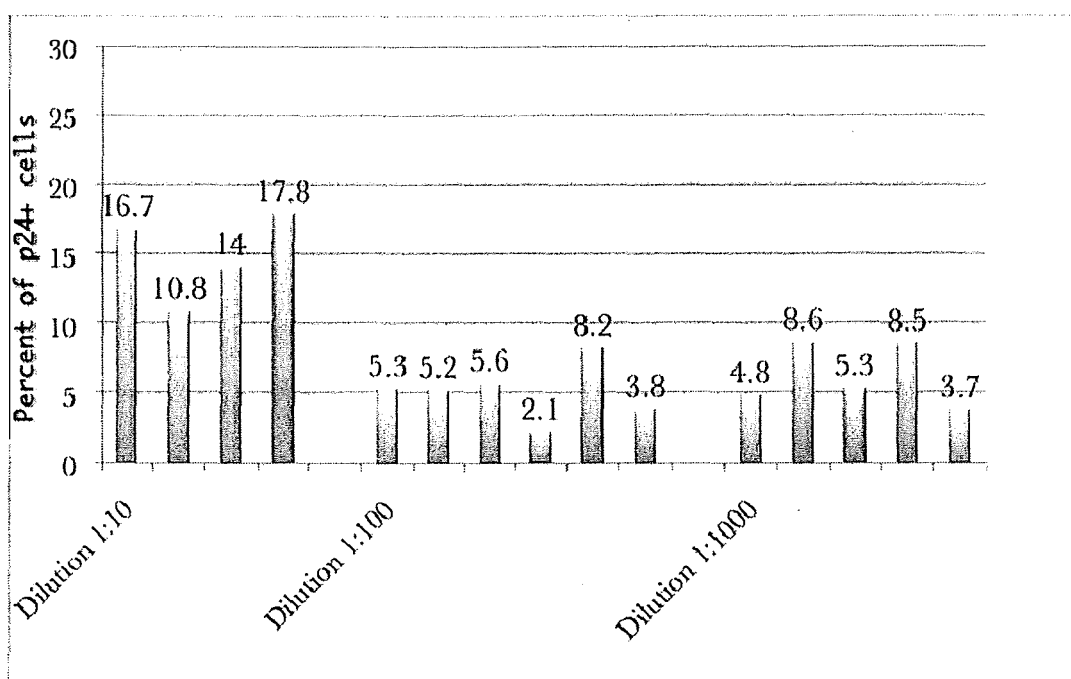
6) HIV superinfection และ HIV infection assay

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม PBMC ของอาสาสมัคร
2. แยก CD4 positive cells จาก PBMC โดยใช้ CD4 magnetic beads
3. Resuspend cell ใน PHA medium (RPMI1640 supplement with 10% vol/vol FBS and 1 ug/ml PHA)
4. Incubate 37 C, 5% CO₂ นาน 2-3 วัน
5. นำ PHA stimulated CD4 positive cells มาล้างด้วย R10 2 ครั้ง
6. Resuspend ใน R10 1 million per ml
7. ใส่ 100 ul ของ PHA stimulated CD4 positive cells ใน 96-well plate
8. ทำเป็น duplicate experiments
9. เติม 100 ul HIV supernatant
10. Centrifuge 400 xg ที่ 22 C เป็นเวลา 1 hr
11. Incubate ที่ 37 C 5% CO₂ เป็นเวลา 1 hr
12. Centrifuge 400 xg ที่ 22 C เป็นเวลา 5 นาที
13. ล้าง HIV supernatant ด้วย R10 2 ครั้ง
14. เติม IL2 medium 190 ul
15. Incubate ที่ 37 C 5% CO₂
16. Collect HIV supernatant ที่ Day 3, 7, 10 และ 14
17. วัด HIV-gag p24 Ag ด้วย ELISA assay

จากนั้นต้องทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของ HIV supernatant ที่เหมาะสมในการทำ HIV suppression assay โดยการเจือจาง HIV supernatant ที่ 10-fold serial dilution ทั้งหมด 3 dilution คือ 1:10, 1:100, และ 1:1000 เพื่อนำไป superinfection กับ PHA-stimulated PBMC และ PHA-stimulated CD4+ T cells ของอาสาสมัครที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเอชไอวี

รูปที่ 8 กราฟแสดง % HIV-gag p24 positive CD4+ T cells ของ healthy donors ที่วัดได้จาก flowcytometry ของการ infection ด้วย HIV supernatant



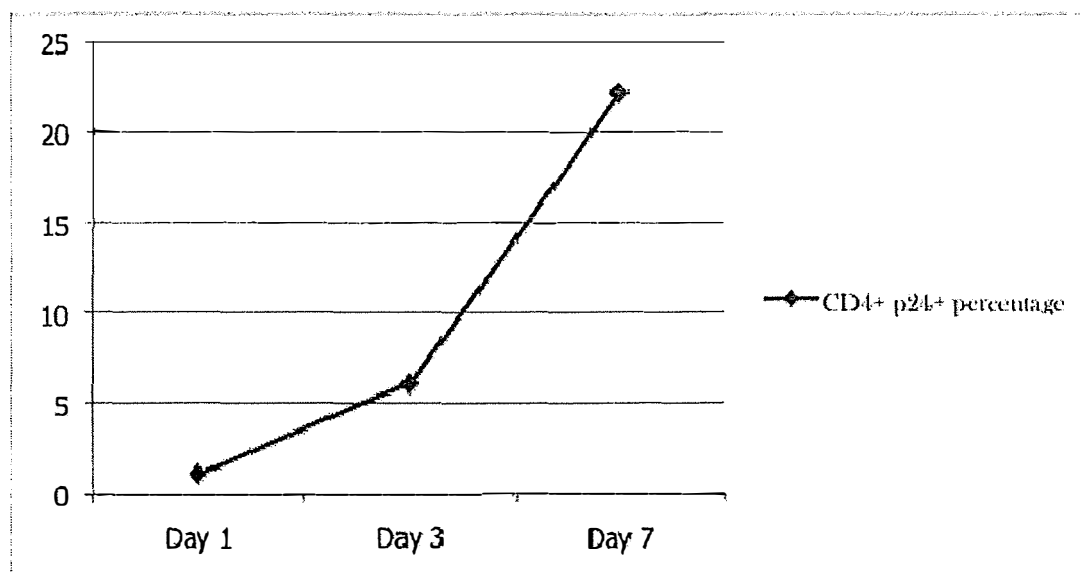
กราฟนี้แสดงปริมาณของ HIV-gag p24 positive CD4+ T cells เป็น % ที่ได้จากการใช้ HIV supernatant ที่แยกได้จาก VC จำนวน 1 isolate มา infect กับ PHA stimulated PBMC จาก Healthy donor จำนวน 7 คน โดยใช้ปริมาณ HIV supernatant ที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 dilutions ด้วยการทำ 10-fold dilution

ที่ 1:10, 1:100, และ 1:1000 และวัดปริมาณ CD4+ T cells ที่ติดเชื้อเอชไอวีจาก HIV supernatant แต่ละ dilutions ด้วยการย้อม intracellular HIV-gag p24 Ag ใน CD4+ T cells และวัดด้วยเครื่อง Flow cytometer

ผลการทำ HIV infection ใน PBMC จาก Healthy donor พบว่าที่ dilution 1:10 มี % ของ HIV-gag p24+ CD4+ T cells มากกว่าที่ dilution 1:100 และ 1:1000 ถึง 3 เท่า ซึ่งที่ dilution 1:100 และ 1:1000 มี % ของ HIV-gag p24+ CD4+ T cells ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าที่ dilution 1:10 เหมาะสมกับการนำไปใช้ เพื่อ superinfection กับ CD4+ T cells ของ HIV infected donors มากที่สุด

ต่อมาเป็นการทดลองหาจำนวนวันซึ่งเหมาะสมที่สุดสำหรับการเก็บ culture supernatant ที่ได้จากการทดลองทำ HIV superinfection โดยทำการทดลองเก็บ culture supernatant ในวันที่ 3, 5, 7, 10, และ 14 หลังจาก superinfection ด้วย HIV isolates จากนั้นวัดความสามารถในการ replication ของ HIV isolate โดยวัดปริมาณของ HIV-gag p24 Ag ใน culture supernatant ด้วย ELISA assay

รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณ HIV-gag p24 positive CD4+ T cells จากการ superinfection กับ PBMC ของ VC ด้วย HIV isolates ของ VC ด้วยการย้อม intracellular HIV-gag p24 Ag ภายในเซลล์

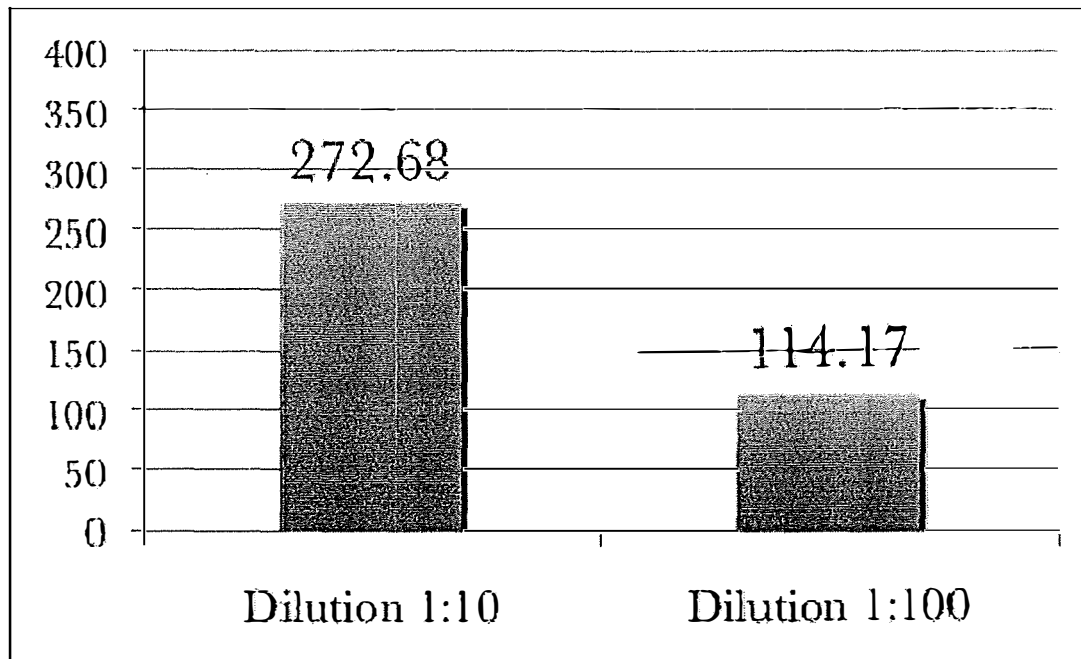


จากการ superinfection ด้วย HIV isolates ของ VC กับ PHA stimulated PBMC ของ VC และวัดปริมาณ HIV infected cells จากการย้อม HIV-gag p24 Ag ภายในเซลล์ของ CD4+ T cells หลังจาก superinfection ที่ day 1, 3 และ 7 พบว่า day 7 หลัง superinfection มีปริมาณของ HIV infected cells มากที่สุด (% ของ HIV-gag p24+ CD3+ CD8- cells) คือ 22.8% ซึ่งมากกว่าที่ day 3 ที่มี HIV infected cells 5.4% ถึง 4 เท่า ดังนั้นในการทำ HIV suppression assay จะทำการวัดผลของ HIV replication หลังจาก superinfection แล้วในวันที่ 7

ต่อมาต้องทำการทดลองเพื่อดูผล HIV superinfection ต่อในการทดลองที่ใช้ PHA stimulated PBMC ของ HIV infected donors จำนวน 1 คนที่เป็น VC และ superinfection ด้วย HIV isolate ที่ได้จาก VC

ที่ dilution ที่แตกต่างกัน คือ 1:10 และ 1:100 จากนั้นวัดปริมาณ HIV-gag p24 Ag จาก culture supernatant เพื่อดูความสามารถของ HIV replication ด้วย ELISA assay ที่วันที่ 7 หลัง HIV superinfection

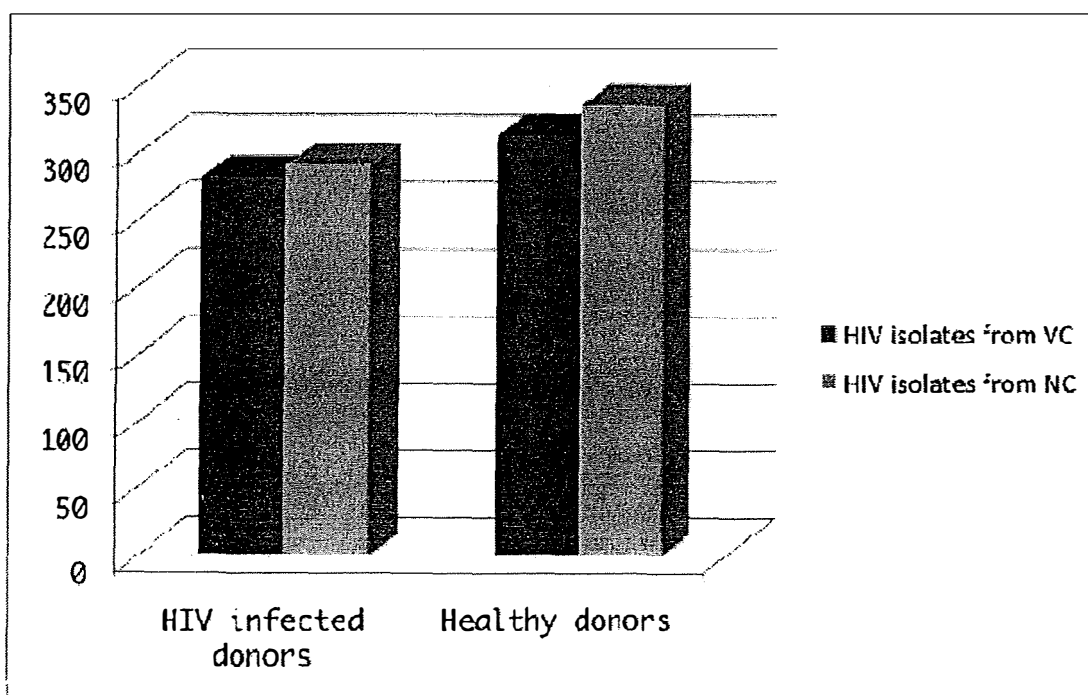
รูปที่ 10 กราฟแสดงปริมาณ HIV-gag p24 Ag จาก culture supernatant ที่วัดด้วย ELISA assay จากการ superinfection ด้วย HIV isolate จาก VC กับ PBMC ของ VC ที่ dilution ต่างกัน



จากกราฟพบว่าผลการทำ HIV superinfection ใน PBMC จาก HIV infected donors ด้วย HIV isolate ที่แยกได้จาก VC และวัดปริมาณของ HIV-gag p24 Ag ด้วย ELISA assay ที่วันที่ 7 หลังจาก HIV superinfection พบว่าที่ dilution 1:10 มีปริมาณของ HIV-gag p24 Ag (272.68 pg/ml) มากกว่าที่ dilution 1:100 (114.17 pg/ml) ถึง 3 เท่า แสดงให้เห็นว่าที่ dilution 1:10 เหมาะสมกับ การนำไปใช้เพื่อ superinfection กับ CD4+ T cells มากที่สุดเช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้จาก healthy donors

เมื่อพบว่า dilution ของ HIV isolates ที่ใช้ superinfection กับ PHA stimulated PBMC ที่ 1:10 หลังจากการทำ HIV superinfection ที่ day 7 ให้ผลดีที่สุด จากนั้นจะทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น แต่เปลี่ยนจากการ superinfection กับ PHA stimulated PBMC เป็น PHA stimulated CD4+ T cells ซึ่งเป็น target cells ของ HIV และทำการทดลองกับ HIV infected donors จำนวน 10 คน และ healthy donors จำนวน 9 คน และใช้ HIV isolates ที่แยกได้จากทั้ง VC และ NC

รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณ HIV-gag p24 Ag จาก culture supernatant ที่วัดด้วย ELISA assay ของการ superinfection และ infection กับ CD4+ T cells ของ HIV infected donors และ healthy donors ด้วย HIV isolates จาก VC และ NC ที่ dilution 1:10



ผลของการ superinfection และ infection ด้วย HIV isolates ที่ได้จาก VC และ NC กับ PHA stimulated CD4+ T cells ของทั้งอาสาสมัครที่เป็น HIV infected donors และ healthy donors จำนวน 10 และ 9 คน ตามลำดับ พบว่า ที่ dilution 1:10 หลังการ superinfection ที่ day 7 ด้วย HIV isolates ที่ได้จากทั้ง VC และ NC พบว่า HIV isolates จากทั้งสองกลุ่มของอาสาสมัครมี replication capacity ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในการทดลอง HIV superinfection ใน HIV infected donors และ HIV infection ใน healthy donors และยังแสดงให้เห็นอีกว่า CD4+ T cells จาก HIV infected donors และ healthy donors สามารถ superinfection และ infection ด้วย HIV isolates ที่ได้จากทั้ง VC และ NC ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามลำดับ

เมื่อได้ condition ที่เหมาะสมสำหรับ HIV superinfection ดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ 10 แสดง condition ที่เหมาะสมสำหรับ HIV superinfection หรือ HIV infection assay

Experiments	Optimum conditions
Dilution of HIV isolates	1:10
Day after HIV superinfection	Day 7

จากนั้นเมื่อได้วิธีการทดลองที่เหมาะสม จะทำการทดลอง HIV superinfection และ HIV infection กับกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมด ดังนี้

ตารางที่ 11 แสดงกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมดที่ทำการทดลอง HIV superinfection หรือ infection

Donors	HIV infected donors (n=52)				Healthy donors
	EC	VC	NC	HAART	
(คน)	2	17	30	3	7

จากอาสาสมัครทั้งหมดดังตารางข้างต้น นำมาแยก CD4+ T cells และ superinfection หรือ infection ด้วย HIV isolates ของทั้ง VC และ NC ที่ dilution 1:10 และวัดความสามารถในการ replication ของ HIV จาก culture supernatant หลังจาก infection ที่ day 7 ด้วย HIV isolates ดังตาราง

ตารางที่ 12 แสดง HIV isolates และ HIV propagation ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด

HIV isolates (n)	HIV isolation from		HIV propagation from	
	VC	NC	VC	NC
จำนวน HIV isolates	2	8	1	2

ตารางที่ 13 แสดงกลุ่มอาสาสมัครที่ทำการทดลอง superinfection หรือ infection ด้วย HIV isolates

Donor	EC	VC	NC	HAART	HD
จำนวนอาสาสมัคร (คน)	2	17	30	3	7
จำนวนครั้งของการทดลอง (ครั้ง)	2	59	79	7	27

จากนั้นวัดผลการทดลอง โดยใช้ culture supernatant ที่ day 7 และวัดด้วย HIV-gag p24 Ag ELISA assay ของอาสาสมัครทั้งสองกลุ่ม

- HIV superinfection คือการใช้ HIV isolates หรือ HIV ที่ได้จากการ propagation มา superinfection กับ PHA activated CD4+ T cells ของอาสาสมัครผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวนทั้งหมด 52 คน และทำการทดลอง โดยการ superinfection ทั้งหมดจำนวน 146 ครั้ง

- HIV infection คือ HIV supernatant หรือ HIV ที่ได้จากการ propagation มา infect กับ PHA activated CD4 T cells ของอาสาสมัครผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อเอชไอวี (Healthy donors) จำนวนทั้งหมด 7 คน และทำการทดลอง โดยการ infection ทั้งหมดจำนวน 27 ครั้ง ซึ่งแสดงดังตาราง

ตารางที่ 14 แสดงกลุ่มอาสาสมัครที่ทำการทดลองและผลการทดลอง superinfection หรือ infection ด้วย

HIV isolates ใน HIV infected donors และ healthy donors

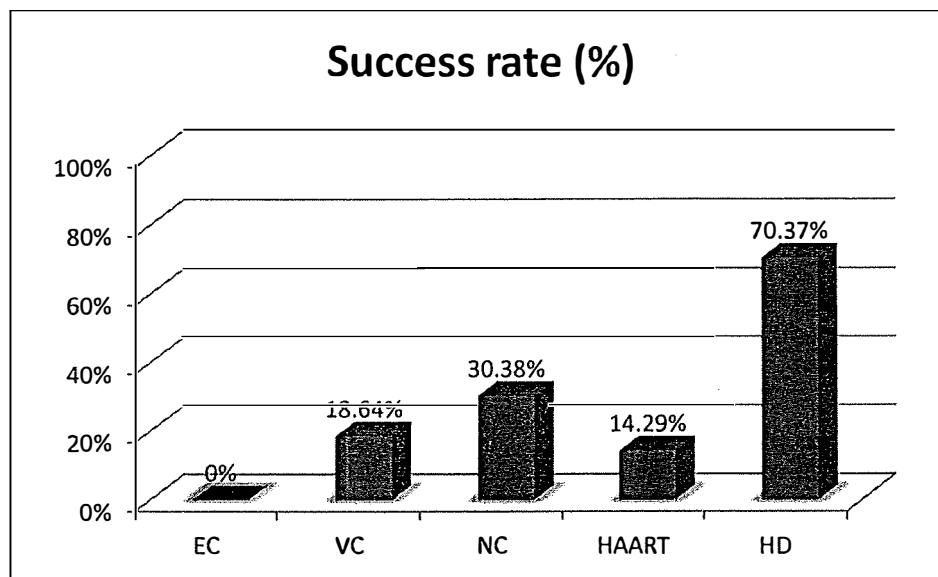
Donor	EC		VC		NC		HAART		HD	
จำนวนอาสาสมัคร (คน)	2		17		30		3		7	
จำนวนครั้งของการทดลอง (ครั้ง)	2		59		79		7		27	
ผล superinfection หรือ infection	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	0	2	11	48	24	55	1	6	19	8
Success rate (%)	0%		18.64%		30.38%		14.29%		70.37%	

+ หมายถึง การทดลองที่สามารถ superinfection หรือ infection ได้ด้วยการวัด ELISA assay

- หมายถึง การทดลองที่ไม่สามารถ superinfection หรือ infection ได้ด้วยการวัด ELISA assay

รูปที่ 12 กราฟแสดงผลการ superinfection และ infection ด้วย HIV supernatant ใน HIV-infected donors

และ Healthy donors



7. เติม 100 ul ของ reconstituted HIV-1 p24 detector antibody
8. Incubate ที่ 37 C นาน 1 ชั่วโมง
9. ล้าง microplate ด้วย 1x Plate wash buffer 6 ครั้ง
10. เติม 100 ul ของ streptavidin-peroxidase working solution
- 11.

ตารางที่ 16 แสดงการเตรียม Streptavidin-peroxidase working solution

No. of strips	Streptavidin-peroxidase (ul)	Assay diluent (ml)
3	40	4
6	70	7
9	100	10
12	120	12

12. Incubate ที่ 37 C นาน 30 นาที
13. ล้าง microplate ด้วย 1x Plate wash buffer 6 ครั้ง
14. เติม 100 ul ของ Substrate working solution

ตารางที่ 17 แสดงการเตรียม Substrate working solution

No. of strips	Substrate (ul)	Substrate buffer (ml)
3	40	4
6	70	7
9	100	10
12	120	12

15. Incubate ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
16. เติม 100 ul ของ Stop solution
17. วัดค่า OD ที่ 450 nm ด้วย ELISA reader

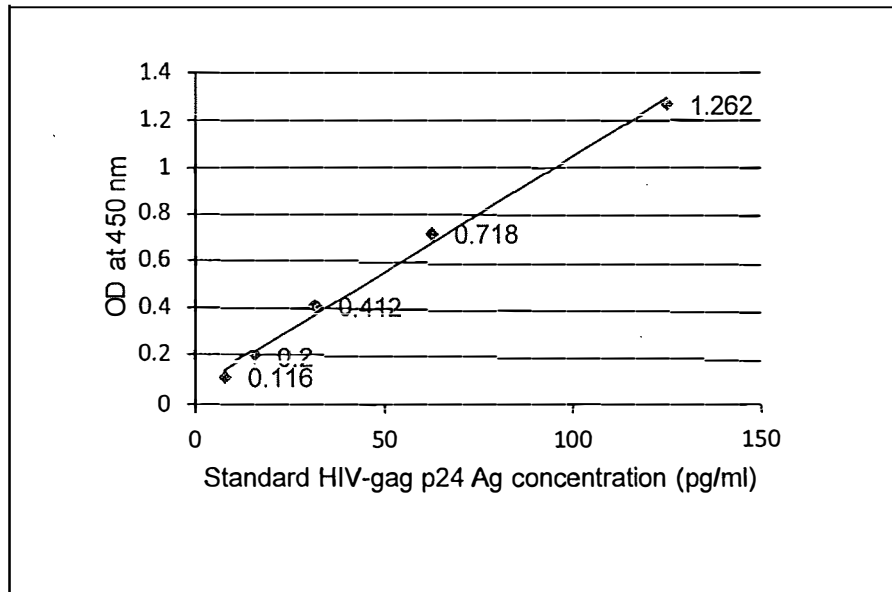
ตารางที่ 18 แสดงค่า OD ของ Standard HIV-gag p24 Ag

Standard number	Concentration (pg/ml)	OD at 450 nm
1	125.0	1.315
2	62.5	0.840
3	31.3	0.508
4	15.6	0.304
5	7.8	0.184
6	0	0.055

18. การคำนวณค่า %Reduction คือ $\%Reduction = 1 - (OD \text{ ของ background} / OD \text{ ของ experiment})$

x100

รูปที่ 13 กราฟแสดง Standard curve ของ Standard HIV-gag p24 Ag



สมการของ Standard curve คือ $y = 0.009x + 0.070$ ใช้สมการนี้ในการหาความเข้มข้น ของเอชไอวี

ใน culture supernatant

สรุปขั้นตอนของการเตรียม HIV เพื่อใช้ในการทำ HIV suppression assay

ตารางที่ 19 แสดงขั้นตอนการทำ HIV isolation และเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนโดยประมาณ

ขั้นตอน	เวลาที่ใช้
การแยก PBMC	3 hrs
การตรวจยีนของ CCR5	5 hrs
การเตรียม PHA stimulated PBMC	3 days
การแยก HIV isolate	5 wks
การ coculture	2 hrs
การเตรียม/เติม culture ใหม่ทุก 7 วัน ของ HIV isolation และ HIV propagation	3 hrs/ 5 wks
การหาค่า TCID50	3 wks
ELISA assay	6 hrs
การเตรียม/เติม culture ใหม่ทุก 7 วัน ของ TDID50 detection	3 hrs/5wks

HIV suppression assay

8) T cell isolation

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม Fresh PBMC ของอาสาสมัคร
2. Centrifuge 300 xg นาน 8 mins ที่ 4 C
3. Resuspend PBMC ใน 100 ul cold buffer
4. เติม 20 ul ของ Untouched T cell Dynal beads และ FBS
5. Incubate ที่ 4 C นาน 20 mins
6. เติม 2 ml cold buffer เพื่อ washing
7. ล้าง 100 ul ของ Untouched T cell Dynal beads และใส่ใน PBMC
8. Incubate ที่อุณหภูมิห้องด้วย shaker
9. Collect ส่วนของ Untouched T cells ด้วย Magnetic stand
10. แบ่งบางส่วนมาข้อมดู purity ด้วย CD3, 4 และ 8 surface markers

การแยก T cells จาก PBMCs ก่อนที่จะไปทำการแยก T cells ให้ได้ส่วนของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells โดยเมื่อแยก T cells แล้วต้องมีการวัดดู Purity ของการแยก T cells จาก PBMC โดยการข้อม surface markers CD3 ด้วย monoclonal antibody และวัดผลด้วย flow cytometer

9) การย้อม Surface markers บนผิวเซลล์ (CD3, 4 และ 8)

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม cell suspension ที่ 100 ul
2. เติม 20 ul Tritest BD antibody mix (CD3, 4 และ 8 monoclonal Ab)
3. Incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มีคนาน 20 นาที
4. ล้างด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง
5. เติม 100 ul ของ 1% Paraformaldehyde
6. วัดด้วย Flow cytometer

ตารางที่ 20 แสดงอาสาสมัครที่ทำการย้อมดู purity ของการแยก T cells ด้วย CD3 surface markers

Donors (คน)	HIV infected donors (n=58)				Healthy donors
	EC	VC	NC	HAART	
70	2	18	35	3	12

อาสาสมัครทั้งหมด 70 คน ที่นำ PBMC มาแยกส่วนของ T cells และย้อม surface marker CD3 ด้วย monoclonal antibody และวัดผลด้วย flow cytometer เพื่อดู % purity ของ T cells หลังจากแยกออกมาจาก PBMC ด้วยวิธี Untouched T cell isolation

ตารางที่ 21 แสดง % Purity ของ T cells ที่แยกจาก PBMC แล้วย้อม surface marker CD3

Donors (คน)	HIV infected donors (n=58)				Healthy donors
	EC	VC	NC	HAART	
70	2	18	35	3	12
%T cells (CD3+)	89	93	92	92	93

ผล % Purity ของ T cells จากการย้อม surface marker CD3 ด้วย monoclonal antibody และวัดผลด้วย flow cytometer พบว่า อาสาสมัครทั้งในกลุ่มของ HIV infected donors และ healthy donors มี % Purity ของ T cells ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ที่ระหว่าง 89-93% และในกลุ่มของ HIV infected donors มี % Purity ของ T cells ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ EC, VC, NC และ HAART โดยมีค่าอยู่ที่ระหว่าง 89-93% เช่นกัน

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การแยก T cells จาก PBMC ด้วยวิธี Untouched T cell isolation สามารถแยก T cells ได้ดีมาก

เมื่อแยกได้ส่วนของ T cells จากการแยกด้วยวิธี Untouched T cell isolation หรือ Negative selection ของ T cells แล้ว ต่อมาจะแยก CD4+ T cells และ CD8+ T cells จากส่วนของ T cells ด้วยการใส่ CD4-

monoclonal antibody coated magnetic beads โดยในส่วนของ CD4+ T cells จะเป็นการแยกแบบ positive selection และส่วนของ CD8+ T cells จะเป็นการแยกแบบ negative selection

10) การแยก CD4 and CD8 positive T cells

ขั้นตอนการทดลอง

1. Resuspend T cell ด้วย MACS buffer
2. Centrifuge 300 xg ที่ 4 C นาน 10 นาที
3. เติม 80 ul MACS buffer และ 20 ul CD4 magnetic beads (MACS)
4. Incubate ที่ 4 C นาน 15 mins
5. ล้างด้วย 2 ml MACS buffer 2 ครั้ง
6. Resuspend ด้วย 500 ul MACS buffer
7. เตรียม MS column และ Magnetic stand
8. ใส่ cell suspension ลงใน Column
9. เติม 500 ul MACS buffer ทั้งหมด 3 ครั้ง
10. นำ Column ออกจาก Magnetic stand ใ้ลงในหลอดใหม่
11. นำ Plunger ชะ CD4+ T cells ออกจาก column
12. ทำการย้อมดู purity ของการแยก CD4+ และ CD8+ T cells ด้วยการย้อม surface marker ของ CD3, 4 และ 8

ตารางที่ 22 แสดงอาสาสมัครที่ทำการย้อมดู purity ของการแยก CD4+ T cells ออกจาก T cells ด้วยการย้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers

Donors (คน)	HIV infected donors (n=58)				Healthy donors
	EC	VC	NC	HAART	
70	2	18	35	3	12

อาสาสมัครทั้งหมด 70 คน ที่นำ T มาแยกส่วนของ T cells และย้อม surface marker CD3 ด้วย monoclonal antibody และวัดผลด้วย flow cytometer เพื่อดู % purity ของ T cells หลังจากแยกออกมาจาก PBMC ด้วยวิธี Untouched T cell isolation

ตารางที่ 23 แสดง % Purity ของ CD4+ T cells ที่แยกจาก T cells แล้วย้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers

Donors (คน)	HIV infected donors (n=58)				Healthy donors
	EC	VC	NC	HAART	
70	2	18	35	3	12
%Purity of CD4+ T cells (CD3+CD4+CD8-)	95	96	94	95	97

ผลของการแยก CD4+ T cells จาก T cells แล้วย้อม surface markers CD3, CD4, และ CD8 เพื่อดูว่า CD4+ T cells มี CD8+ T cells ปนมาหรือไม่ โดยการดูที่ % purity ของ CD4+ T cells

จากอาสาสมัครทั้งหมด 70 คน พบว่า % purity ของ CD4+ T cells อยู่ระหว่าง 94-97 % ซึ่งอาสาสมัครกลุ่ม HIV infected donors และ healthy donors สามารถแยก CD4+ T cells ได้ % purity ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม HIV infected donors ทั้ง EC, VC, NC และ HAART ก็ สามารถแยก % purity ของ CD4+ T cells ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นกัน

ตารางที่ 24 แสดง % Purity ของ CD8+ T cells ที่แยกจาก T cells แล้วย้อม CD3, CD4, และ CD8 surface markers

Donors (คน)	HIV infected donors (n=58)				Healthy donors
	EC	VC	NC	HAART	
70	2	18	35	3	12
%Purity of CD8+ T cells (CD3+CD4-CD8+)	86	88	82	88	87

ผลของการแยก CD8+ T cells จาก T cells และย้อม surface markers CD3, CD4, และ CD8 เพื่อดูว่า CD8+ T cells มี CD4+ T cells ปนมาหรือไม่ โดยการดูที่ % purity ของ CD8+ T cells

จากอาสาสมัครทั้งหมด 70 คน พบว่า % purity ของ CD8+ T cells อยู่ระหว่าง 82-87 % ซึ่งอาสาสมัครกลุ่ม HIV infected donors และ healthy donors สามารถแยก CD8+ T cells ได้ % purity ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม HIV infected donors ทั้ง EC, VC, NC และ HAART ก็ สามารถแยก % purity ของ CD8+ T cells ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นกัน

ตารางที่ 25 แสดง % Purity ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่แยกจาก T cells ด้วยย้อม CD3, CD4,

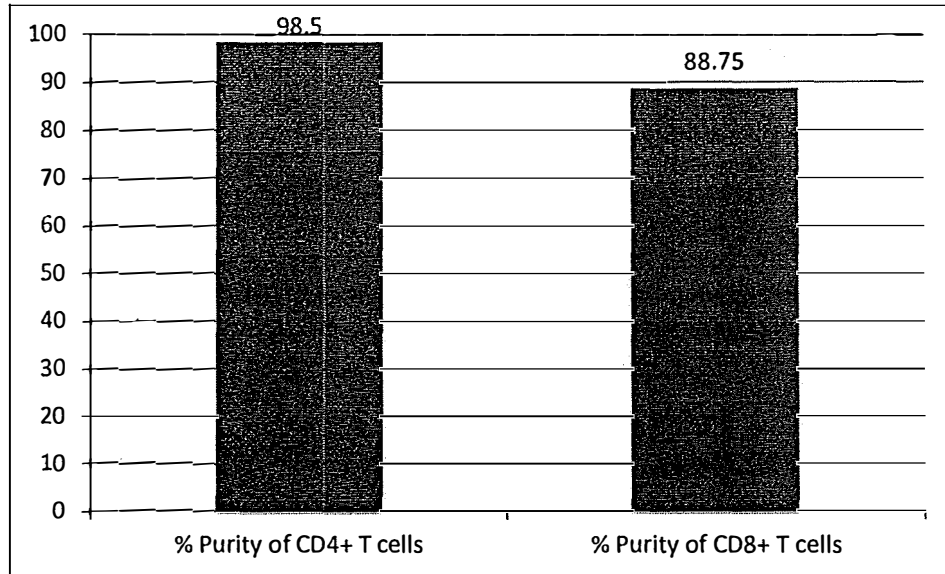
และ CD8 surface markers

Donors (คน)	HIV infected donors (n=58)				Healthy donors
	EC	VC	NC	HAART	
70	2	18	35	3	12
%Purity of CD4+ T cells (CD3+CD4+CD8-)	95	96	94	95	97
%Purity of CD8+ T cells (CD3+CD4-CD8+)	86	88	82	88	87

ผลการแยก CD4+ T cells และ CD8+ T cells จาก T cells ของอาสาสมัครทั้งหมด 70 คน พบว่า มี % purity สูง แสดงถึงควมมีประสิทธิภาพของการแยก CD4+ T cells และ CD8+ T cells ด้วยวิธี Untouched T cell isolation และ CD4 positive selection ด้วยการใช้ เทคโนโลยี monoclonal antibody coated magnetic beads ซึ่งอาสาสมัครแต่ละ กลุ่มก็สามารถแยกได้อย่างมีประสิทธิภาพพอๆ กัน โดยการแยก CD4+ T cells จะมี % purity ที่สูงกว่าการแยก CD8+ T cells เนื่องจากใช้การแยกแบบ positive selection

รูปที่ 14 กราฟแสดง % Purity ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ที่แยกจาก T cells แล้วย้อม CD3, CD4,

และ CD8 surface markers



11) การย้อม Surface markers บนผิวเซลล์ (CD3, 4 และ 8)

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม cell suspension ที่ 100 ul
2. เติม 20 ul Tritest BD antibody mix (CD3, 4 และ 8 monoclonal Ab)
3. Incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 20 นาที
4. ล้างด้วย 1x PBS จำนวน 2 ครั้ง
5. เติม 100 ul ของ 1% Paraformaldehyde
6. วัดด้วย Flow cytometer

12) การย้อม Intracellular HIV-gag p24 protein

ขั้นตอนการทดลอง

1. Resuspend cell ใน 100 ul labeling buffer
2. ย้อม surface markers ด้วย antibody ต่อ CD3, CD4 และ CD8
3. Incubate นาน 20 นาที ในที่มืด
4. เติม 1 ml ICS wash buffer เพื่อล้าง 2 ครั้ง
5. เติม 250 ul permeabilized solution
6. Incubate นาน 20 นาที ที่ 4 C
7. เติม 1 ml ICS wash buffer เพื่อล้าง 2 ครั้ง
8. ย้อม HIV-gag p24 protein ด้วย antibody ต่อ p24 protein 3 ul และใช้ isotype control 3 ul เพื่อเป็น control ใน 47 ul ของ buffer
9. Incubate นาน 30 นาที ที่ 4 C
10. เติม 1 ml ICS wash buffer เพื่อล้าง 2 ครั้ง
11. เติม 200 ul ของ 1% paraformaldehyde
12. วัดด้วยเครื่อง flow cytometer

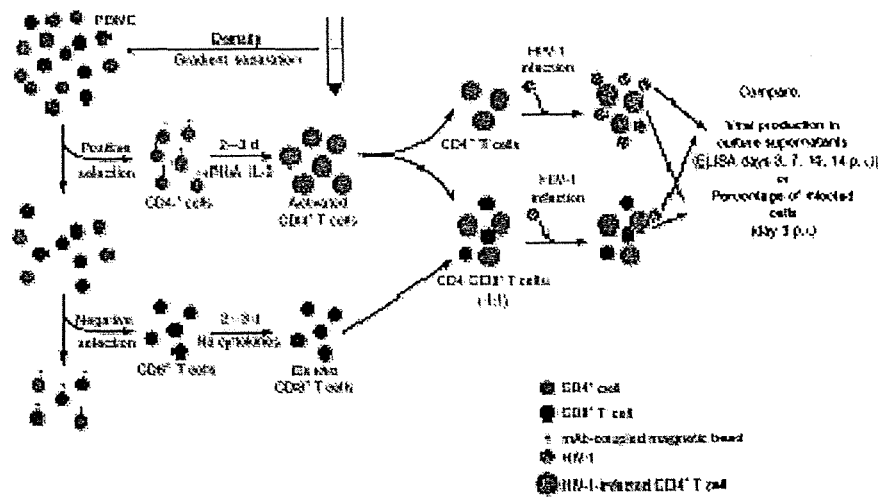
13) HIV suppression assay ด้วย Bulk CD8+ T cells

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียม PBMC ของอาสาสมัคร .
2. ทำการแยก T cells ด้วยวิธี Untouched T cell จาก PBMC โดยการใช้น Dyna untouched T cell beads
3. นำ T cells มาแยกเป็นส่วนของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells ด้วยวิธี CD4 positive selection โดยการใช้ MACS CD4 magnetic beads
4. Resuspend ส่วนของ CD4+ T cells ใน PHA medium และ CD8+ T cells ใน R10 medium
5. Incubate ที่ 37 C, 5% CO₂ นาน 3 วัน
6. เก็บ culture ของ CD4+ T cells และ CD8+ T cells
7. ล้างเซลล์ด้วย R10 จำนวน 2 ครั้ง
8. นับเซลล์และ resuspend ใน IL2 medium ที่ 1 million per ml
9. เติม 100 ul ของ PHA stimulated CD4+ T cells ใน 96-well plate
10. ตามด้วยการเติม 100 ul ของ Bulk CD8+ T cells
11. Centrifuge ที่ 400 xg, 22 C นาน 1 hrs
12. Incubate ที่ 37 C, 5% CO₂ เป็นเวลา 1 hr
13. Centrifuge 400 xg ที่ 22 C เป็นเวลา 5 นาที
14. ล้าง HIV supernatant ด้วย R10 2 ครั้ง
15. เติม IL2 medium 190 ul
16. Incubate ที่ 37 C 5% CO₂
17. Collect HIV supernatant ที่ Day 3, 7, 10 และ 14

18. วัด supernatant ด้วย HIV-gag p24 ELISA assay ที่ 450 nm

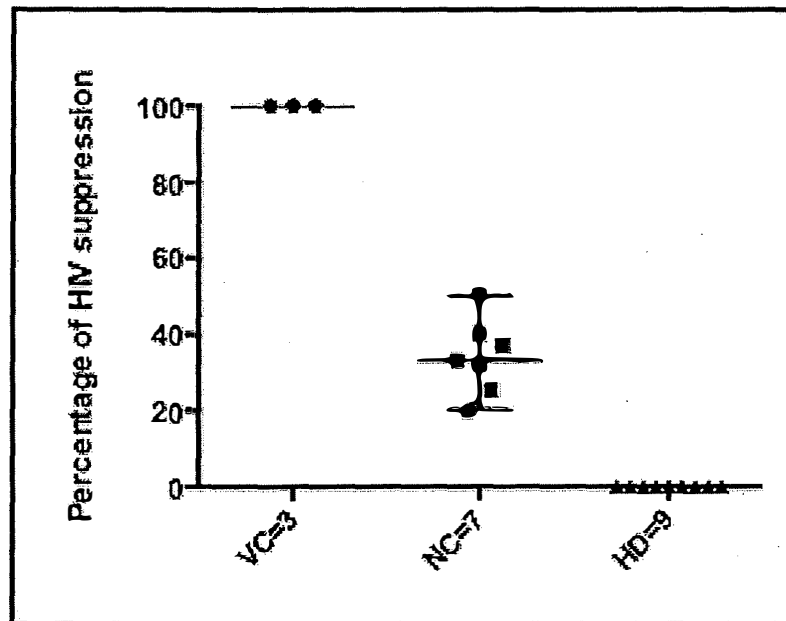
รูปที่ 15 ภาพแสดงการทำการทดลอง HIV suppression ด้วย Bulk CD8+ T cells



ตารางที่ 26 แสดงการทำการทดลอง HIV suppression assay ด้วย Bulk CD8+ T cells

การทดลอง	ส่วนประกอบ
Negative control	Autologous CD4+ T cells
Positive control	Autologous CD4+ T cells ที่ superinfection ด้วย HIV supernatant
Experiment	Autologous CD4+ T cells ที่ superinfection ด้วย HIV supernatant และ Bulk CD8+ T cells

รูปที่ 16 กราฟแสดง % HIV suppression ของ controllers, noncontrollers และ healthy donors



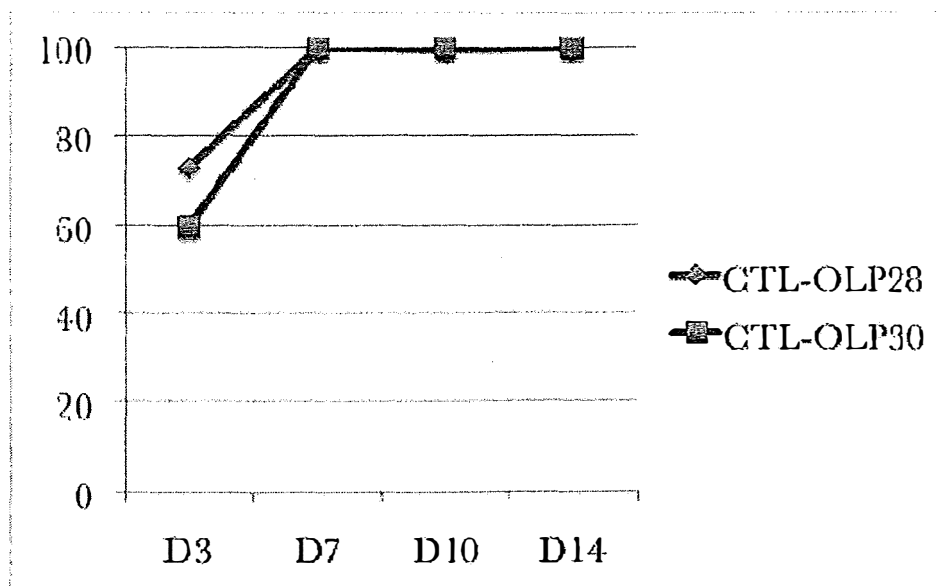
กลุ่มอาสาสมัครทั้งหมด 19 คน ประกอบด้วย HIV infected donors จำนวน 10 คน และ healthy donors จำนวน 9 คน ซึ่ง HIV infected donors มี controllers จำนวน 3 คน และ noncontrollers จำนวน 7 คน ซึ่งอาสาสมัครจะ superinfection และ infection ด้วย HIV isolates ที่แยกได้และใช้ที่ dilution 1:10 กับ PHA stimulated CD4+ T cells ของ HIV infected donors และ healthy donors ตามลำดับ จากนั้น coculture กับ bulk CD8+ T cells (Unstimulated CD8+ T cells) และเก็บ supernatant ในวันที่ 7 หลังจาก coculture จากนั้น วัด HIV-gag p24 Ag ใน culture supernatant ด้วย ELISA assay และคำนวณผลเป็น % HIV suppression หรือความสามารถ ในการยับยั้ง HIV replication ด้วย bulk CD8+ T cells

ผลการทดลอง HIV suppression ในกลุ่มอาสาสมัครทั้งหมด 19 คน พบว่า กลุ่ม HIV infected donors ที่เป็น controllers ทั้งหมด 3 คน สามารถยับยั้ง HIV replication ได้ 100% คือ ไม่สามารถตรวจพบ HIV-gag p24 Ag ใน culture supernatant ของการทดลองที่มี bulk CD8+ T cells ส่วนกลุ่ม HIV infected donors ที่เป็น noncontrollers ทั้งหมด 7 คน พบว่าสามารถยับยั้ง HIV replication ได้น้อยกว่าของกลุ่มอาสาสมัคร controllers อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า bulk CD8+ T cells ของ controllers มีความสามารถในการยับยั้ง HIV replication ได้มากกว่า noncontrollers โดยดูจากค่า % HIV suppression ที่มากกว่า และในกลุ่มอาสาสมัครที่เป็น healthy donors จำนวน 9 คน พบว่า bulk CD8+ T cells ไม่สามารถยับยั้ง HIV replication ได้เลย ซึ่งดูได้จากค่า % HIV suppression ที่เท่ากับ 0

เมื่อพบว่า bulk CD8+ T cells หรือ unstimulated CD8+ T cells ของ controllers มีความสามารถในการยับยั้ง HIV replication ได้มากกว่า noncontrollers จากนั้นจะทำการทดลอง HIV suppression โดยใช้ HIV-gag p24 specific T cell lines มาใช้แทน bulk CD8+ T cells เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง HIV replication ด้วย HIV specific T cells โดยทำการทดลองเทียบกันในกลุ่มอาสาสมัคร HIV infected donors ที่เป็น controllers และ noncontrollers โดยทำการวัดผล HIV suppression ด้วยการย้อม intracellular HIV-gag p24 Ag ซึ่งแสดงปริมาณของ HIV infected CD4+ T cells ที่ลดลงเมื่อ coculture ร่วมกับ HIV specific T cell lines และทำการวัดค่า HIV-gag p24 Ag ใน culture supernatant ด้วย ELISA assay ซึ่งจะแสดงผลของการยับยั้ง HIV replication ใน culture supernatant หรือค่า %HIV suppression

รูปที่ 17 กราฟแสดง HIV suppression ด้วย HIV-specific T cell lines ของ controllers จากการวัด

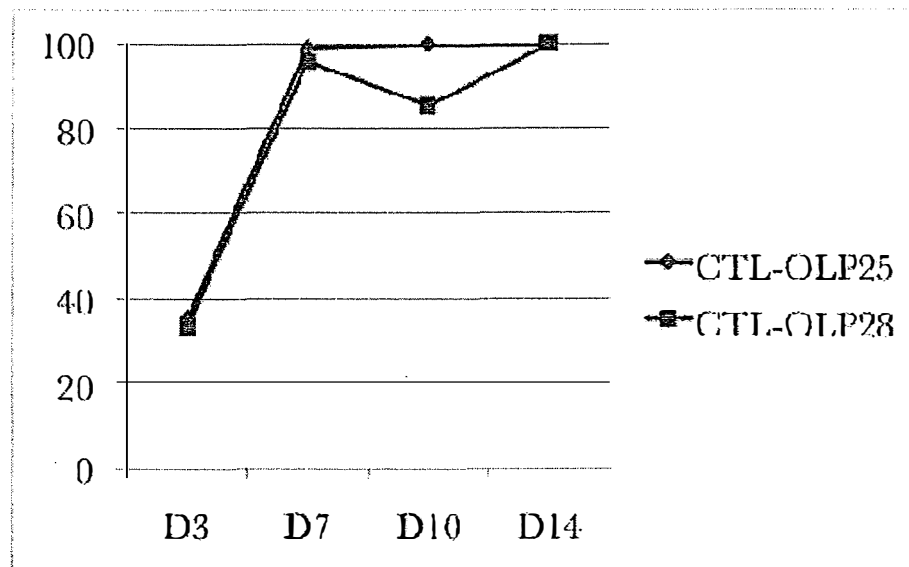
intracellular HIV-gag p24 Ag ของ CD4+ T cells



จากกราฟพบว่า HIV-gag p24 specific T cell lines ของ controllers ต่อ epitopes QATQEVKNW (OLP28) และ TSTLQEQIGW (OLP30) ที่ day 7 เป็นต้นไปสามารถกำจัด HIV infected CD4+ T cells ได้ทั้งหมด ซึ่งแสดงด้วยค่า % HIV suppression จากกราฟ

รูปที่ 18 กราฟแสดง HIV suppression ด้วย HIV-specific T cell lines ของ noncontrollers จากการวัด

intracellular HIV-gag p24 Ag ของ CD4+ T cells



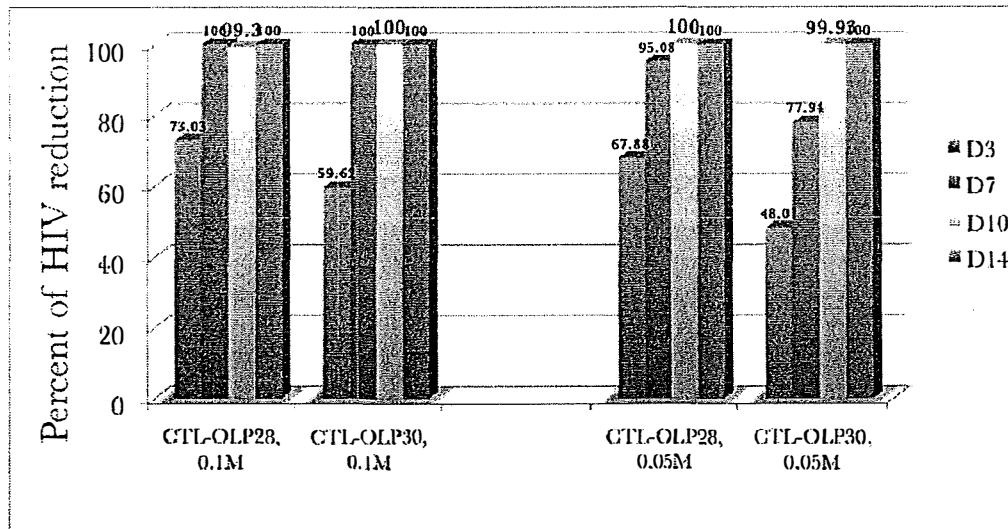
จากกราฟพบว่า HIV-gag p24 specific T cell lines ของ noncontrollers ต่อ epitopes KGFNPEVIPMF (OLP25) และ QATQEVKNW (OLP28) ที่ day 7 เป็นต้นไปสามารถกำจัด HIV infected CD4+ T cells ได้จนเกือบหมด ซึ่งแสดงด้วยค่า % HIV suppression จากกราฟ

จากผลการวัด %HIV-gag p24+ CD4+ T cells เพื่อหาค่า % HIV suppression ด้วยการให้ HIV specific T cell lines ของกลุ่มอาสาสมัคร HIV infected donors ที่เป็น controllers และ noncontrollers พบว่า ที่ day 3 อาสาสมัคร controllers มี % HIV suppression มากกว่า noncontrollers และที่ day 7, 10 และ 14 พบว่า controllers มี % HIV suppression เป็น 100% ทั้งหมด ส่วนในกลุ่ม noncontrollers มี % HIV suppression เป็น 100% เช่นกัน ยกเว้นที่ day 10 ของ HIV specific T cell line ต่อ QATQEVKNW (OLP28)

ต่อมาจะทำการทดลอง HIV suppression ด้วย HIV specific T cell lines เช่นเดิม แต่เปลี่ยนจากการวัดผล % HIV suppression ด้วยการย้อม intracellular HIV-gag p24 Ag ของ CD4+ T cells เป็นการวัด % HIV suppression จาก culture supernatant โดยวัด HIV-gag p24 Ag ด้วย ELISA assay

รูปที่ 19 กราฟแสดง % HIV suppression ด้วย HIV-specific T cell lines ของ controllers จากการวัด HIV-gag

p24 Ag ใน culture supernatant ด้วย ELISA assay



กราฟแสดงการทำ HIV suppression assay ด้วย HIV-gag p24 specific T cell lines ของ controllers ต่อ epitopes QATQEVKNW (OLP28) และ TSTLQEQIGW (OLP30) และทำการวัดผล % HIV suppression ที่ day 3, 7, 10 และ 14 ด้วยการวัด HIV-gag p24 Ag ใน culture supernatant พบว่า ที่ day 3 มี % HIV suppression ที่ 59-73 % และที่ day 7, 10 และ 14 มี % HIV suppression ที่ประมาณ 95-100% ยกเว้นที่ day 7 ของ HIV-gag p24 specific T cell lines ต่อ epitope TSTLQEQIGW (OLP30)

5. อภิปรายและวิจารณ์ผล

อุปสรรคสำคัญในการพัฒนาวัคซีนโรคเอดส์ ได้แก่ การขาดความรู้ความเข้าใจในเรื่องกลไกการป้องกันและการควบคุมการติดเชื้อ HIV นอกจากนี้ การทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีน HIV ทางห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน บอกได้แต่เพียง immunogenicity ของวัคซีนเท่านั้น แต่บอกไม่ได้ว่าภูมิคุ้มกันดังกล่าวจะสามารถป้องกันการติดเชื้อได้หรือไม่ เช่น การทดสอบการตอบสนองของ T cell โดยการหลั่ง gamma interferon (IFN γ) ด้วย ELISpot assay ที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่ของ vaccine trial ในขณะนี้ ถึงแม้ว่าจะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง และ high throughput แต่งานวิจัยในระยะหลังแสดงให้เห็นว่า การวัดการตอบสนองของ T cell โดยวิเคราะห์ IFN γ อย่างเดียว ไม่ได้แสดงถึง protective immunity ของผู้ติดเชื้อ HIV ดังนั้น การมีการตอบสนองของ T cell ที่วิเคราะห์ด้วย IFN γ ELISpot assay ในผู้ที่ได้รับ HIV vaccine จึงไม่ได้มีความหมายว่า อาสาสมัครนั้นมีภูมิ “คุ้มกัน” ต่อการติดเชื้อ HIV แต่อย่างใด ผู้วิจัยจึงเสนอการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์การตอบสนองด้วยวิธี (HIV replication) suppression assay เพื่อแสดงผลโดยตรงของ T cell ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ HIV

คณะผู้วิจัยจะได้รับสมัครอาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV จำนวน 10 คน โดยแบ่งเป็น TP 5 คน และ VC 5 คนและเจาะเลือดเพื่อทำการแยก Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) และ plasma ทำการแยกเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวน HIV จาก CD4+ T cells จากอาสาสมัคร โดยใช้เทคนิคในการ isolation ที่ทั้งที่เคยตีพิมพ์ แล้วและคิดแปลงเอง พัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้ง HIV replication โดย CD8+ T cells และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง HIV โดย T cell ในอาสาสมัครที่มี clinical outcome ซึ่งแตกต่างกัน

6. สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัย ได้วิเคราะห์และพัฒนาการทดสอบซึ่งสามารถวัดประสิทธิภาพโดยตรงของทีเซลล์ใน
อาสาสมัครคนไทยในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ HIV โดยผู้วิจัยเชื่อว่าการทดสอบนี้จะเป็นเครื่องมือที่สำคัญ
ในการวิเคราะห์กลไกในการป้องกันการติดเชื้อ HIV และสามารถใช้ในการทดสอบสำหรับประเมิน
ประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันโรคเอดส์

7. บรรณานุกรม

[1] Orrell C. Antiretroviral adherence in a resource-poor setting. *Current HIV/AIDS*

reports. 2005 Nov;2(4):171-6.

[2] Friis-Moller N, Weber R, Reiss P, Thiebaut R, Kirk O, d'ArminioMonforte A, et al.

Cardiovascular disease risk factors in HIV patients--association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *Aids*. 2003 May 23;17(8):1179-93.

[3] Geretti AM. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naïve persons.

Curr Opin Infect Dis. 2007 Feb;20(1):22-32.

[4] Kelleher AD, Long C, Holmes EC, Allen RL, Wilson J, Conlon C, et al. Clustered

mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted

cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2001;193(3):375-86.

[5] Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. Evidence of HIV-1 adaptation to

HLA-restricted immune responses at a population level. *Science*. 2002 May 24;296(5572):1439-43.

[6] Letvin NL, Daniel MD, Sehgal PK, Desrosiers RC, Hunt RD, Waldron LM, et al.

Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science*. 1985

Oct 4;230(4721):71-3.

[7] Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the

chimpanzee *Pan troglodytes* [see comments]. *Nature*.

1999;397(6718):436-41.

[8] Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6588-92.

[9] Currier JR, deSouza M, Chanbancherd P, Bernstein W, Birx DL, Cox JH.

Comprehensive screening for human immunodeficiency virus type 1 subtype-specific CD8 cytotoxic T lymphocytes and definition of degenerate epitopes restricted by HLA-A0207 and -C(W)0304 alleles. *J Virol*. 2002 May;76(10):4971-86.

[10] Tovanabutra S, Watanaveeradej V, Viputtikul K, De Souza M, Razak MH, Suriyanon V, et al. A new circulating recombinant form, CRF15_01B, reinforces the linkage between IDU and heterosexual epidemics in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003 Jul;19(7):561-7.

[11] Montefiori DC, Pantaleo G, Fink LM, Zhou JT, Zhou JY, Bilska M, et al. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis*. 1996;173(1):60-7.

[12] Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kim A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol*.

1997;71(5):3734-41.

- [13] Moore JP, Cao Y, Qing L, Sattentau QJ, Pyati J, Koduri R, et al. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J Virol.* 1995 Jan;69(1):101-9.
- [14] Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, et al. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis.* 1997;176(4):924-32.
- [15] Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Davis C, Shaunak S, Downie J, et al. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *Aids.* 2000;14(3):225-33.
- [16] Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* 1998;279(5359):2103-6.
- [17] Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, KerkhofGarde SR, Bende RJ, Keet IP, et al. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med.* 1995;181(4):1365-72.
- [18] Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women [published erratum appears in *Nat Med* 1995 Jun;1(6):598]. *Nat Med.* 1995;1(1):59-64.

[19] Rowland-Jones SL, Dong T, Dorrell L, Ogg G, Hansasuta P, Krausa P, et al. Broadly cross-reactive HIV-specific cytotoxic T-lymphocytes in highly- exposed persistently seronegative donors. *ImmunolLett.* 1999;66(1-3):9-14.

[20] Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, Kimani J, Krausa P, Newell H, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV- resistant prostitutes in Nairobi [see comments]. *J Clin Invest.* 1998;102(9):1758-65.

[21] Hansasuta P, Rowland-Jones SL. What makes some people resistant to HIV infection? *Current Medical Literature-Infectious Diseases.* 2000;14:85-91.

[22] Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med.* 1997;3(2):212-7.

[23] Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature.* 2001;412(6844):334-8.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)

นาย ปกรัฐ หังสตุต

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank

Mr.Pokrath Hansasuta

2. เลขหมายบัตรประชาชน

3-7105-000555-75-1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

หน่วยงานและที่อยู่: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนน
พระราม 4 เขตปทุมวัน กทม. 10330

เบอร์โทรศัพท์ 0-22564132, 0-817633700

เบอร์โทรสาร 0-22525952

อีเมล Pokrath.H@Chula.ac.th, Pokrath@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรบัณฑิต	สัตววิทยา	2531
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	แพทยศาสตรบัณฑิต	แพทยศาสตร์	2536
University of Oxford	Doctor of Philosophy *	Clinical Medicine	2544

*Under supervision of Professor S.L. Rowland-Jones

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

T cell Immunology, Adoptive T cell therapy, HIV Immunology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 T cell responses to Human Influenza virus: Background information for universal Influenza vaccine development (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

7.2.2 The role of HIV-specific T cells in highly-exposed persistently seronegative persons and HIV-infected donors with good clinical outcome (สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย)

ต้นฉบับขาดหาย

the 'quality' of the cytotoxic T Lymphocyte (CTL) response in protection against HIV infection? Immunol Lett. 2001 Nov 1;79(1-2):15-20.

7.3.14 "Cross-clade CTL in Thai HIV-infected Subject" in "8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)" at Chicago, USA between 4th- 8th February 2001

7.3.15 **Hansasuta, P** and Rowland-Jones, S.L. What makes some people resistant to HIV infection? Current Medical Literature-Infectious Diseases 2000;14:85-91.

7.3.16 "A Novel HLA-Cw1-restricted gag A/E CTL epitope, YSPVSILDI, identified in HIV-1-infected Thai patients (CROI)" at "10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)" at Boston, USA between 10th -14th February 2003
 "Predominance of Nef-specific CD8 cell responses in acute HIV infection and Persistence of HIV-specific CD8+ Memory cells during Viral suppression" in "7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections" (CROI) at San Francisco, USA between 30th January - 2nd February 2000

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพใน

7.4.1 T cell responses to Human Influenza virus: Background information for universal Influenza vaccine development (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) การวิจัยลู่วงแล้วประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์

7.4.2 The role of HIV-specific T cells in highly-exposed persistently seronegative persons and HIV-infected donors with good clinical outcome (สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย) การวิจัยลู่วงแล้วประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์

7.4.3 The Epstein-Barr Nuclear Antigen-1-, Latent Membrane Protein-1-and Latent Membrane Protein-2-specific T cell responses in patients with Epstein-Barr Virus associated malignancies (ทุนงบประมาณแผ่นดิน 2549 ถึง 2552) การวิจัยลู่วงแล้วประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์

7.4.4 The establishment of human dendritic cells suitable for cancer immunotherapy (ทุนงบประมาณแผ่นดิน 2549 ถึง 2552) การวิจัยตุ่่วงแล้วประมาณ 75 เปอร์เซนต์

7.4.5 Development of HLA-peptide tetrameric complexes for the study of CTL responses in HIV and viral opportunistic infections (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) การวิจัยตุ่่วงแล้วประมาณ 80 เปอร์เซนต์

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ

นางสาวยาดา ตันสิริ

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr, Mrs, Miss, Rank

Ms Yada Tansiri

2. เลขหมายบัตรประชาชน

1-1002-00101-73-8

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

นิสิตปริญญาคุุญ์บัณฑิต

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลข โทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

หน่วยงานและที่อยู่: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพระราม ๔ เขตปทุมวัน กทม. 1330

เบอร์โทรศัพท์ 0-22564172, 0-867337990

เบอร์โทรสาร 0-22525952

อีเมล yadaayada@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขา	ปีพุทธศักราชที่จบ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	เทคนิคการแพทย์	2549

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

T cell Immunology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศโดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง): ระบุเฉพาะหลังคศ. 2000

-

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยถูกลงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

-