

รายงานการวิจัย

เรื่อง

อิทธิพลของความหลากหลายและการแสดงออกของ cytokine, chemokine, และ

chemokine receptor ยีน ต่อการดำเนินของโรค

ภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี

โดย

ดวงนภา กิ่งแก้ว

สนธิ มกรแก้วเกียร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
นิวัฒน์ มณีกาญจน์

Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2548 และ 2549) ในการสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผศ. นพ. วินัย สุริยานนท์ ที่ช่วยจำแนกกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีตามการดำเนินโรค และให้คำปรึกษาจนทำให้การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณ ดีอคเตอร์ Janet McNicholl ที่ช่วยแนะนำและแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินการวิจัยรวมทั้งให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำแนวทางในการแปลผลและวิจารณ์ผลกระทดลอง

ขอขอบคุณ คุณจันทน์ กิ่งแก้ว ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และ คุณสินีนาด แต่เจริญกุล ในการจัดการข้อมูลจากผู้ติดเชื้อเอชไอวี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

บทคัดย่อ

Single nucleotide polymorphisms (SNP) ซึ่งเป็นการแทนที่นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งด้วยนิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นบนลำดับของ ดี เอ็น เอ ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้าน genetic หลายชนิด รวมถึงความสัมพันธ์ของ SNPs กับโรคต่างๆ ด้วย SNPs ที่เกิดขึ้นบนบริเวณ promoter, coding และ ปลาย 3' ของยีนซึ่งเป็นตำแหน่งที่ควบคุมการทำงานของยีนอาจมีผลต่อปริมาณการผลิตโปรตีนจากยีนนั้นๆ การศึกษาก่อนหน้านี้ได้พบความสัมพันธ์ของระดับ TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, RANTES, SDF-1, CCR5 และ CCR2 กับการดำเนินโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี 1 ทำให้คาดว่า SNPs ที่มีผลต่อระดับการผลิตโปรตีนจากยีน ไซโตไคน์ เคโมไคน์ และตัวรับ เคโมไคน์ เหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 การศึกษาอิทธิพลของ SNPs ณ ตำแหน่ง -308 ของยีน *TNFC α* , +874 ของยีน *IFNY*, -589 ของยีน *IL4*, -1082, -819, -592 ของยีน *IL10*, 59029 ของยีน *CCR5*, 190 ของยีน *CCR2*, -28 ของยีน *RANTES* และ 801 ของยีน *SDF1* ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในผู้ที่ติดเชื้อสายพันธุ์ B แต่ไม่ค่อยมีการศึกษาในผู้ที่ติดเชื้อสายพันธุ์อื่น การศึกษานี้จึงได้ศึกษาถึงผลของ SNPs เหล่านี้ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ CRF01_AE ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 259 คนที่ได้รับเชื้อจากการมีเพศสัมพันธ์กับคู่นอนต่างเพศ การตรวจหาจีโนไทป์ของ SNPs ของยีน *TNFC α* , *IFNY*, *IL4*, *CCR5* และ *CCR2* ใช้วิธี PCR-SSP ส่วนการตรวจหา จีโนไทป์ ของ SNPs ของยีน *IL10* ใช้วิธี multiplex PCR-SSP การตรวจหาจีโนไทป์ของ SNPs ของยีน *RANTES* และยีน *SDF1* ใช้วิธี sequencing และ วิธี tetra-primer PCR-SSP ตามลำดับ จากนั้นได้ใช้ Kaplan-Meier survival curves และ Cox proportional hazard models ในการวิเคราะห์ผลของ SNPs เหล่านี้ ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ผลการศึกษาพบว่า SNPs ของไซโตไคน์ยีนทุกตัว มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ยกเว้น SNP ของยีน *TNFC α* โดยผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีชีวิตโรคดีกว่า และมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตต่ำกว่า ($P = 0.052$ และ $P = 0.054$ ตามลำดับ) แสดงว่า ATA haplotype มีแนวโน้มสูงที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง การศึกษาหาปริมาณ IL-10 mRNA ที่ผลิตจาก PBMCs หลังจากการกระตุ้นด้วย LPS พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินของโรคช้า มีแนวโน้มที่จะสร้าง IL-10 mRNA ต่ำกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินของโรคปกติ แสดงว่า แนวโน้มของ ATA haplotype ในการทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง อาจจะเป็นผลมาจากการผลิต IL-10 mRNA ในปริมาณที่ลดลง สำหรับ SNP ของยีน *IL4* นั้นพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *IL4*-589 TT จีโนไทป์ มีแนวโน้มจะมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตต่ำกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีจีโนไทป์นี้ ($P = 0.120$) แสดงว่า *IL4*-589T อัลลิล มีแนวโน้มที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ติด

เชื้อเอชไอวีที่มี *IFN γ* +874 TT หรือ TA จีโนไทป์มีแนวโน้มจะมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตต่ำกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *IFN γ* +874 AA genotype ($P = 0.133$) แสดงว่า *IFN γ* +874T อัลลีล มีแนวโน้มทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง สำหรับ SNPs ของยีนเคโมไคน์และตัวรับเคโมไคน์นั้นไม่พบความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีแนวโน้มมากที่สุดในการทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง ตามด้วย *IL4*-589T และ *IFN γ* +874T อัลลีล ตามลำดับ

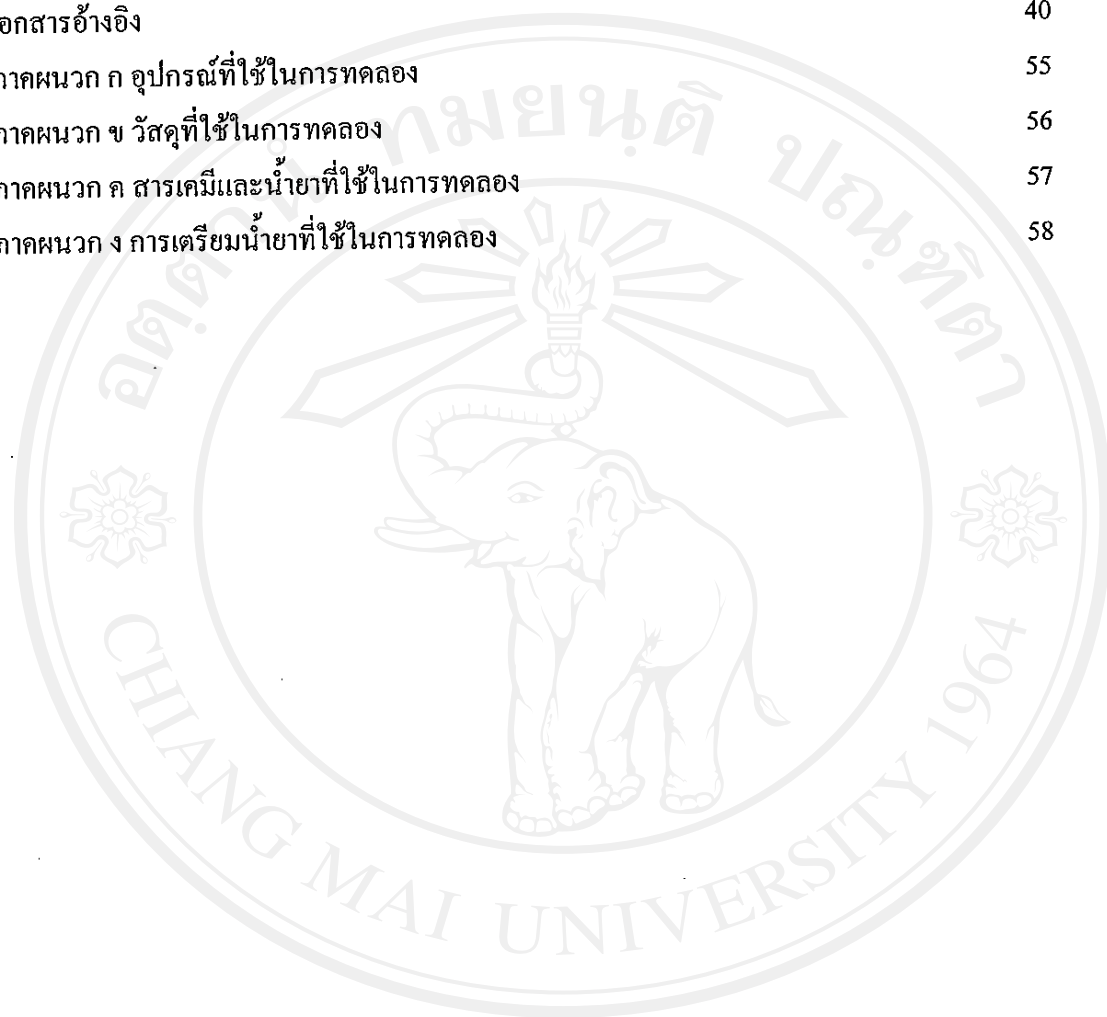
การศึกษาที่พบว่า ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีแนวโน้มสูงและ *IL4*-589T และ *IFN γ* +874T อัลลีล มีแนวโน้มในระดับหนึ่งที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง จะเป็นแรงกระตุ้นให้มีการศึกษาอื่นๆ ที่มีความแตกต่างกันในด้าน สายพันธุ์ของเชื้อเอชไอวี การออกแบบการศึกษา เชื้อชาติ ลักษณะของกลุ่มประชากร ความถี่ของอัลลีล และความถี่ของ haplotype เพื่อยืนยันถึงบทบาทของ haplotype และ อัลลีล เหล่านี้ต่อการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อ เอช ไอ วี 1 ซึ่งอาจทำให้ทราบ markers ที่ถูกต้องของการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 เพื่อปรับปรุงการวางแผนการรักษาให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูปภาพ	viii
คำย่อและสัญลักษณ์	ix
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	3
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	4
SNPs	4
ไวรัสเอชไอวีและการดำเนินของโรคลงหลังการติดเชื้อ	5
การเข้าสู่เซลล์ของไวรัส	5
ภูมิคุ้มกันวิทยาและการติดเชื้อเอชไอวี	7
SNP ของยีน cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคลงหลังการติดเชื้อเอชไอวี	9
SNP ของยีน chemokine และ chemokine receptor ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคลงหลังการติดเชื้อเอชไอวี	12
วิธีการดำเนินการวิจัย	14
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาและจริยธรรมการวิจัย	14
การเก็บตัวอย่าง	15
การตรวจการติดเชื้อเอชไอวีและการตรวจนับประชากรย่อยของเซลล์เม็ดเลือดขาว	15
การตรวจหา SNP ของยีน cytokine, chemokine และ chemokine receptor	16
การตรวจการแสดงออกของยีน	21
ผลการทดลอง	23
คุณลักษณะของกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อเอชไอวีในวันที่เข้าร่วมโครงการ	23
ความถี่ของ genotype, อัลลีล และ haplotype และ ความสัมพันธ์ของ ยีน cytokine, chemokine และ chemokine receptor กับการมีชีวิตรอดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี	24
การแสดงออกของยีน <i>IL10</i> และการดำเนินของโรคติดเชื้อเอชไอวี	33

วิจารณ์ผลการทดลอง	34
สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก ก อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	55
ภาคผนวก ข วัสดุที่ใช้ในการทดลอง	56
ภาคผนวก ค สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง	57
ภาคผนวก ง การเตรียมน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง	58



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อ Primers และลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับการตรวจหา SNP โดยวิธี PCR-SSP	17
2	Primers และ annealing temperatures สำหรับการตรวจหา SNP โดยวิธี PCR-SSP	18
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และ annealing temperatures สำหรับ multiplex PCR-SSP	19
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และ annealing temperatures สำหรับ tetra-primer PCR-SSP	20
5	คุณลักษณะของกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อเอชไอวีในวันที่เข้าร่วม โครงการ	23
6	ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ <i>TNFA</i> -308G/A	24
7	ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ <i>IFNγ</i> +874T/A	25
8	ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ <i>IL4</i> -589C/T	26
9	ความถี่ของ genotype อัลลีล และ haplotype ของ <i>IL10</i> promoter	27
10	ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ <i>RANTES</i> -28 SNP	29
11	ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ <i>SDF1</i> -3' SNP	30
12	ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ <i>CCR5</i> -59029G/A	31
13	ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ <i>CCR2</i> -64 SNP	32
14	ความถี่ของ genotype และ haplotype ของแต่ละยีนในประชากรภาคเหนือ ของประเทศไทย	38

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญรูปร่าง

รูปที่	หน้า
1 Single nucleotide polymorphisms	4
2 โครงสร้างของอนุภาคเอชไอวี	5
3 ลักษณะอาการ ปริมาณ CD4+ T cells และ ปริมาณ HIV RNA ภายหลังการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี	6
4 การดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี	7
5 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>TNFα</i> -308 GG genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>TNFα</i> -308 GA หรือ AA genotype	24
6 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>IFNγ</i> -874 TT หรือ TA genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>IFNγ</i> -874 AA genotype	25
7 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>IL4</i> -589 TT เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>IL4</i> -589 CC หรือ CT genotype	26
8 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี 2, 1 และ ไม่มี ATA haplotype (a) และในผู้ติดเชื้อที่มี และ ไม่มี ATA haplotype (b)	28
9 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>RANTES</i> -28 CC genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>RANTES</i> -28 CG genotype	29
10 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>SDF1</i> -3' GG genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี <i>SDF1</i> -3' GA หรือ AA genotype	30
11 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อที่มี <i>CCR5</i> -59029 GG, GA และ AA genotype	31
12 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีเอชไอวีที่มี <i>CCR5</i> -59029 GG, GA และ AA genotype	32
13 การแสดงออกของ <i>IL10</i> โดยการวัดปริมาณ <i>IL10</i> mRNA ใน PBMCs ภายใต้อการกระตุ้นด้วย LPS และ P24 antigen โดยเปรียบเทียบกับ PBMCs ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น	33

ตัวย่อและสัญลักษณ์

A	Adenosine
C	Cytidine
CA	Capsid protein
CCR2	CC receptor 2
CCR5	CC receptor 5
CD	Cluster of differentiation
CDC	Centers for Disease Control
cDNA	Complementary DNA
CM	Complete medium
CMI	Cell mediated immunity
CO ₂	Carbon dioxide
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
Ct	Cycle threshold
CXCR4	CXC receptor 4
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphates
Env	Envelope
EtBr	Ethidium bromide
FAM	Fluorescein amidite
FBS	Fetal bovine serum
FcRs	Fc receptors
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G	Guanosine
gDNA	Genomic DNA
gp	Glycoprotein
HARRT	Highly active antiretroviral therapy
HCl	Hydrochloric acid

HEPS	Highly HIV-1 exposed but persistently seronegative
HGH	Human growth hormone
HRP	Horse radish peroxidase
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
HMI	Humoral mediated immunity
kb	Kilobase
IDUs	Injecting drug users
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Immunoglobulin G
IN	Integrase
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
LPS	Lipopolysaccharide
MA	Matrix protein
MgCl ₂	Magnesium chloride
MHC	Major histocompatibility complex
MIP-1 α	Macrophage inflammation protein 1 α
MIP-1 β	Macrophage inflammation protein 1 β
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NAbs	Neutralizing antibodies
Nef	Negative regulatory factor
NC	Nucleocapsid
NH ₄ Cl	Ammonium chloride
NIH	National Institutes of Health
NK cell	Natural killer cell
NP	Normal progressors
NSI	Non-syncytium inducing

NT	Neutralizing antibody
PBS	Phosphate buffered saline
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
PCR-SSP	Polymerase chain reaction-sequence specific primer
PMNs	Polymorphonuclear cell
PR	Protease
RANTES	Regulated on activation, normal T expressed and secreted
Real-time qRT-PCR	Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RT	Reverse transcriptase
SDF1	Stromal cell derived factor 1
SI	Syncytium inducing
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
T	Thymidine
Ta	Annealing temperature
TCR	T cell receptor
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
Tris-NH ₄ Cl	Tris-ammoniumchloride
UTR	Untranslated region
UV	Ultra violet
%	เปอร์เซ็นต์
γ	Gamma
α	Alpha
g	Gravity

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ไวรัสเอชไอวีได้รับความสนใจเป็นครั้งแรกในต้นปี 1981 โดยแพทย์พบว่ามีคนไข้ที่เป็น Kaposi's sarcoma และ *Pneumocystis carinii* เพิ่มสูงขึ้นในผู้ชายรักร่วมเพศในเมืองนิวยอร์กและ ลอสแอนเจลิส ประเทศสหรัฐอเมริกา แม้ว่าในระยะเริ่มต้นผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่วนใหญ่ในสหรัฐฯ จะเป็นชายรักร่วมเพศแต่ปัจจุบันพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม heterosexual ในปี 2551 UNAIDS ได้รายงานระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสเอชไอวีทั่วโลก [1] ว่าในปี 2550 มีผู้ติดเชื้อเอชไอวี ประมาณ 33 ล้านคน (30-36 ล้านคน) ในจำนวนนี้มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีใหม่ประมาณ 2.7 ล้านคน (2.2-3.2 ล้านคน) และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 2 ล้านคน (1.8-2.3 ล้านคน)

ในประเทศไทยมีรายงานผู้ป่วยเอดส์รายแรกในเดือนกันยายน พ.ศ. 2527 ในชายรักร่วมเพศ ที่กลับมาจากสหรัฐอเมริกาโดยในระหว่างที่อยู่ในสหรัฐอเมริกาได้มีคู่นอนหลายคน [2] ต่อจากนั้น อุบัติการณ์การติดเชื้อในประเทศไทยได้สูงขึ้นเรื่อยๆ ในปี พ.ศ. 2551 รายงานความก้าวหน้าของ ประเทศไทยต่อ UNAIDS [3] พบว่าในปี 2550 มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีประมาณ 546,578 คน มีผู้ติดเชื้อ ใหม่ ลดลงมาจาก 143,00 คน ในปี 2533 (ซึ่งเป็นปีที่มีผู้ติดเชื้อใหม่สูงที่สุด) เหลือ 13,936 คน แม้ว่า ประเทศไทยจะประสบความสำเร็จในการควบคุมการระบาดของเชื้อไวรัสเอชไอวี แต่ความชุกใน กลุ่มผู้ติดยาเสพติดก็ยังคงสูงถึง 30-50% ในช่วง 15 ปีที่ผ่านมา [4] และในปี 2549 พบว่าอุบัติการณ์ใน กลุ่มผู้ติดยาเสพติดในภาคเหนือสูงถึง 10.2% [5] นอกจากนี้ในปี 2550 พบว่าความชุกในชายรักร่วมเพศทั่วไปสูงถึง 30.7% โดยมีอุบัติการณ์อยู่ที่ 36.2% ในชายรักร่วมเพศที่ขายบริการทางเพศ [3] นอกจากนั้นการเปลี่ยนแปลงทางสังคมของประเทศไทยทำให้ปัจจุบันนี้ความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ในวัยรุ่นเพิ่มสูงขึ้นเนื่องวัยรุ่นเหล่านี้มีเพศสัมพันธ์ก่อนวัยอันควรและมีเพียงส่วนน้อยที่ใช้ถุงยางอนามัย (20-30%) [6] ดังนั้นจึงควรที่จะมีโปรแกรมเร่งด่วนในการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวีใน ประชากรกลุ่มต่างๆ เหล่านี้

การศึกษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวี พบว่าระยะเวลาหลังการติดเชื้อไปสู่อาการเอดส์จะมีความ แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้วระยะเวลาหลังการติดเชื้อไปสู่อาการเอดส์จะใช้เวลาประมาณ 10 ปี (Normal progressor; NP) ผู้ติดเชื้อเอชไอวีบางคนมีการดำเนินของโรคไปสู่อาการเอดส์อย่างรวดเร็ว ภายใน 5 ปี (Rapid progressor; RP) ในขณะที่บางคนไม่มีการดำเนินของโรคแม้จะติดเชื้อมาเป็น เวลานานมากกว่า 10 ปี (Long term non-progressor; LTNP) อัตรานในการดำเนินของโรคที่แตกต่าง กันนั้นเป็นผลเนื่องมาจาก 2 ปัจจัยคือปัจจัยทางด้านตัวเชื้อไวรัสและปัจจัยทางด้านระบบภูมิคุ้มกัน ของร่างกาย ปัจจัยทางด้านตัวเชื้อไวรัสได้แก่ ปริมาณไวรัสและสายพันธุ์ของเชื้อ ส่วนปัจจัย ทางด้านระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ neutralizing antibody, HIV-specific cytotoxic T cells (CTLs), helper T cells (Th), cytokines, chemokines และ chemokine receptors รวมถึงความหลากหลายของยีนที่

เกี่ยวข้องกับได้แก่ Human leukocyte antigen (HLA), cytokine, cytokine receptor, chemokine และ chemokine receptor

ในการศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาพบว่า การตอบสนองของร่างกายเมื่อมีการกระตุ้น antigen presenting cell (APC) ด้วยแอนติเจนนั้น จะมีผลทำให้เกิดการตอบสนองของร่างกายที่แตกต่างกัน 2 แบบคือ แบบที่ 1 เป็นการตอบสนองทางด้าน cell mediated immunity (CMI) เมื่อ APC ถูกกระตุ้นโดยแอนติเจน APC จะหลั่ง type-1 cytokine ซึ่งมีผลเหนี่ยวนำให้ Th0 มีการแบ่งตัวเปลี่ยนแปลงไปเป็น Th1 และหลั่ง type-1 cytokine แบบที่ 2 เป็นการตอบสนองทางด้าน humoral mediated immunity (HMI) โดย APC ที่ถูกกระตุ้นจะหลั่ง type-2 cytokine ซึ่งมีผลเหนี่ยวนำให้ Th0 มีการแบ่งตัวเปลี่ยนแปลงไปเป็น Th2 และหลั่ง type-2 cytokine การตอบสนองที่แตกต่างกันนี้มีผลทำให้การดำเนินของโรคในแต่ละคนมีความแตกต่างกัน จากการศึกษาพบว่าในกรณีของเชื้อเอชไอวีนั้นการตอบสนองแบบ Th1 จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีกว่า Th2

การศึกษาก่อนหน้านี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่าง single nucleotide polymorphisms (SNPs) กับระดับของไซโตไคน์ เคโมไคน์ และตัวรับเคโมไคน์ โดย SNPs ที่ทำการศึกษานั้นเป็น SNPs ที่อยู่ในตำแหน่งที่ควบคุมการสร้างไซโตไคน์ เคโมไคน์ และตัวรับเคโมไคน์ ทำให้ต่อมาได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ SNPs ของยีนไซโตไคน์และเคโมไคน์และตัวรับเคโมไคน์ กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ในขณะที่ SNPs ของไซโตไคน์ เคโมไคน์ และตัวรับเคโมไคน์ ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ B มีการศึกษาค่อนข้างมาก แต่การศึกษาในสายพันธุ์ circulating recombinant form (CRF01_AE) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยมีเพียง 2 การศึกษาเท่านั้น คือการศึกษาโดย Nguyen และคณะ [7] ในปี พ.ศ. 2547 ที่แสดงว่า chemokine receptor 5 (CCR5) haplogroup E เร่งการดำเนินของโรคได้เร็วกว่า CCR5 haplogroup อื่นๆ และการศึกษาของ Wichuchinda และคณะ [8] ในปี พ.ศ. 2549 ที่พบว่า IL4-589T สามารถทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลงได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาถึงความหลากหลายของ cytokine, chemokine และ chemokine receptor ยีนร่วมกับการแสดงออกของยีนที่มีอิทธิพลต่อการดำเนินไปสู่พยาธิสภาพของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ CRF01_AE

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีน cytokine, chemokine และ chemokine receptor ที่มีอิทธิพลต่อการดำเนินไปสู่พยาธิสภาพของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีอิทธิพลต่อการดำเนินไปสู่พยาธิสภาพของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี

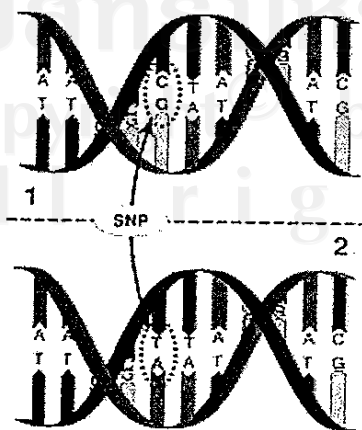


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

SNPs

SNPs เป็นความหลากหลายของลำดับดีเอ็นเอที่พบได้บ่อยที่สุด โดยคิดเป็น 90% ของความหลากหลายของลำดับดีเอ็นเอที่พบในสิ่งมีชีวิต [9] SNPs เกิดจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งด้วยนิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่ง (รูปที่ 1) ผู้ที่มีนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน ณ ตำแหน่งเดียวกับบนคู่โครโมโซมเรียกว่า homozygous ในขณะที่ผู้ที่มีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน ณ ตำแหน่งเดียวกับบนคู่โครโมโซมเรียกว่า heterozygous โดยเฉลี่ยแล้วจะสามารถพบ SNPs ได้ในทุกๆ 1000 นิวคลีโอไทด์บนจีโนมของมนุษย์ [10-14] ซึ่งปัจจุบันนี้มีพบว่ามากกว่า 9 ล้าน SNPs บนจีโนมของมนุษย์ SNPs จึงมีบทบาทที่สำคัญในการกำหนดลักษณะที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ ส่วนใหญ่แล้ว SNPs มักไม่ค่อยมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานและปริมาณของยีนแต่บาง SNPs อาจมีผลต่อการทำงานและปริมาณของโปรตีนได้ บนดีเอ็นเอของมนุษย์พบว่า มีเพียง 3-5% ของดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่ในการผลิตโปรตีน ดังนั้น SNPs ส่วนใหญ่จึงพบนอกบริเวณ coding region [14, 15] SNPs บน non-coding region หรือ บริเวณ regulatory region อาจมีผลต่อการทำงานของยีนโดยมีผลต่อระดับของการผลิตโปรตีนของยีนนั้นๆ เช่น SNPs ที่พบบน enhancer หรือ silencer อาจมีผลทำให้อัตราการ transcription เปลี่ยนแปลงได้ ส่วน SNPs ที่เกิดในบริเวณ promoter region ณ ตำแหน่งที่ transcription-regulatory protein มาจับอาจมีผลทำให้อัตราการ transcription เพิ่มขึ้นหรือลดลงส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน SNPs ที่เกิดในบริเวณ 5' หรือ 3' untranslated region (UTR) ของยีน อาจมีผลต่อความคงตัวของ RNA ที่สร้างขึ้นใหม่ ส่วน SNPs ที่เกิดในบริเวณ coding region อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนบนโปรตีนและมีผลต่อการทำงานของโปรตีนนั้นๆ ได้

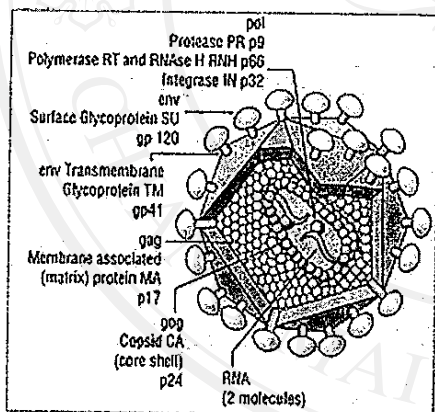


รูปที่ 1 Single nucleotide polymorphisms

(คัดลอกมาจาก <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2e/Dna-SNP.svg/180px-Dna-SNP.svg.png>)

ไวรัสเอชไอวีและการดำเนินของโรครายหลังการติดเชื้อ

อนุภาคเอชไอวีมีขนาดประมาณ 100-120 นาโนเมตร เปลือกด้านนอกประกอบด้วยชั้นไขมันที่ได้มาจากเซลล์ในขณะที่ไวรัสออกมาจากเซลล์ บนเปลือกด้านนอกมี glycoprotein 2 ชนิดคือ glycoprotein120 (gp120) และ glycoprotein41 (gp41) ได้ชั้นเปลือกนอกเป็นส่วนของ matrix protein (MA หรือ p17) ซึ่งล้อมรอบส่วนที่สำคัญที่สุดของอนุภาคไวรัสที่เรียกว่า core ซึ่งประกอบด้วย capsid protein (CA หรือ p24) ภายใน core มีจีโนมของไวรัสที่เป็น RNA สายเดี่ยวเหมือนกัน 2 เส้น โดยแต่ละเส้นมีขนาด 9.2 กิโลเบส RNA สายเดี่ยวนี้จับกับ nucleocapsid protein (NC หรือ P7) และเอ็นไซม์ที่สำคัญของไวรัส 3 ชนิดคือ protease (PR หรือ p9) reverse transcriptase (RT หรือ p66) และ integrase (IN หรือ p32) ภายในอนุภาคของไวรัสยังมีโปรตีนอื่นๆ ของไวรัส ได้แก่ Transactivator of transcription (Tat), Negative regulatory factor (Nef), Regulator of the expression of virion proteins (Rev), Viral infectivity factor (Vif), Viral protein R (Vpr) และ Viral protein U (Vpu) (รูปที่ 2)

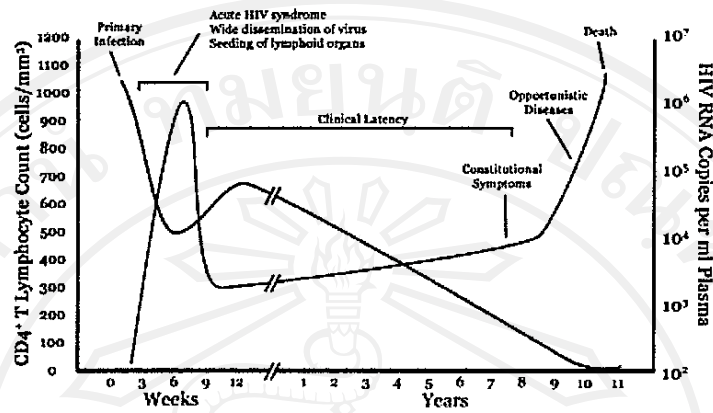


รูปที่ 2 โครงสร้างของอนุภาคเอชไอวี (คัดลอกมาจาก http://student.bmj.com/back_issues/1198/data/1198ed1.htm)

การเข้าสู่เซลล์ของไวรัส

ภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี ประมาณ 50% ของผู้ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการ ส่วนอีก 50% มีอาการคล้ายหวัดภายใน 4 สัปดาห์ โดยอาการหลังการติดเชื้อจะแบ่งออกเป็น 3 ระยะ (รูปที่ 3) คือระยะที่ 1 เรียกว่า Primary infection ในระยะนี้ผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะมีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดสูงมาก (อาจสูงถึง 10^8 copies ต่อมิลลิลิตรในพลาสมา) และจำนวน CD4+ T cells จะลดลงอย่างมาก [16] ระยะที่ 2 เรียกว่า Asymptomatic state หรือ Clinical latency ซึ่งเป็นระยะที่ผู้ติดเชื้อไม่แสดงอาการ ปริมาณไวรัสในกระแสเลือดลดลงและเข้าสู่ viral set point เนื่องจากร่างกายของผู้ติดเชื้อผลิตภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอชไอวีผู้ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการป่วยแต่ไวรัสยังมีการเพิ่มจำนวนในต่อมน้ำเหลือง และระดับ CD4+ T cells จะลดลงอย่างต่อเนื่องระยะที่ 3 เรียกว่า

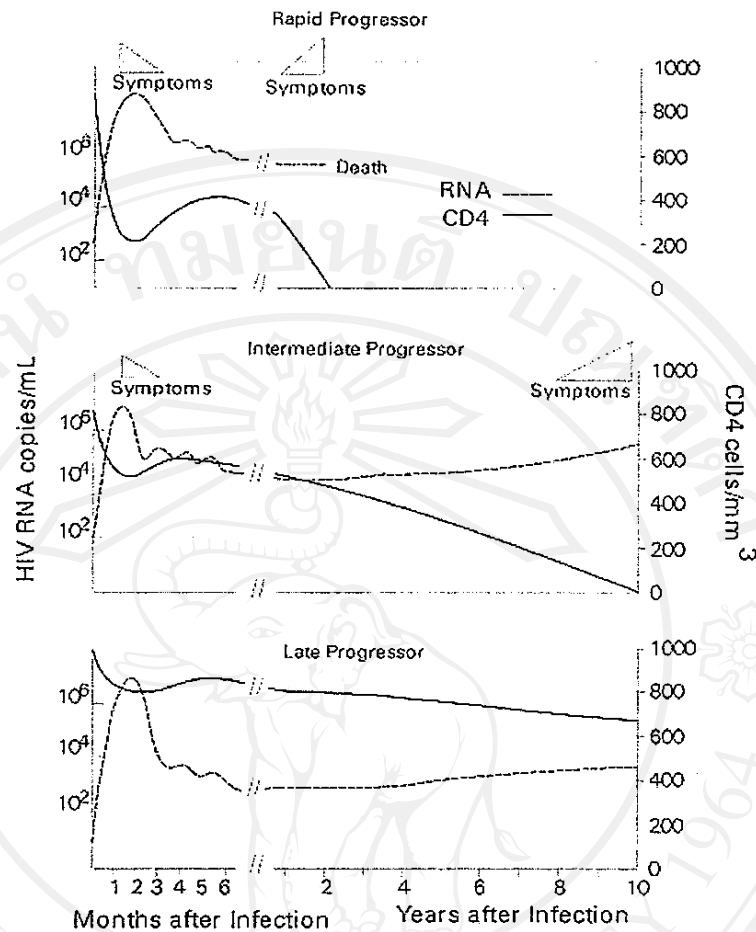
Symptomatic state เป็นระยะที่ผู้ติดเชื้อแสดงอาการป่วยเนื่องจากโรคติดเชื้อฉวยโอกาสเพราะระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกทำลายจนไม่สามารถควบคุมปริมาณไวรัสได้



รูปที่ 3 ลักษณะอาการ ปริมาณ CD4+ T cells และ ปริมาณ HIV RNA ภายหลังการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (คัดลอกมาจาก <http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/a/a4/Hiv-timecourse.png/450px-Hiv-timecourse.png>)

การดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อไวรัสในการเพิ่มจำนวนในร่างกายและความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันในการต่อสู้กับเชื้อไวรัส ผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละคนมีการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อแตกต่างกัน จึงมีการจำแนกการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเป็น 3 แบบ (รูปที่ 4) คือ

1. ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินของโรคเร็ว จะพบได้ประมาณ 10-15% ของผู้ติดเชื้อทั้งหมด ผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้จะมีการลดลงของ CD4+ T cells อย่างรวดเร็วและมีกลุ่มอาการโรคเอดส์ภายใน 2-3 ปีภายหลังการติดเชื้อ
2. ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินของโรคปกติ ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่ (ประมาณ 70-80%) จะอยู่ในกลุ่มนี้ โดยจะมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไวรัสในกระแสเลือดและการลดลงของปริมาณ CD4+ T cells อย่างต่อเนื่อง และมีกลุ่มอาการโรคเอดส์ภายใน 6-10 ปีภายหลังการติดเชื้อ
3. ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์ แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานาน ผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้จะมีประมาณ 5% ของผู้ติดเชื้อทั้งหมด โดยปริมาณไวรัสในกระแสเลือดและปริมาณ CD4+ T cells ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลามากกว่า 10 ปี



รูปที่ 4 การดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี
(คัดลอกมาจาก <http://www.aidsrestherapy.com/content/4/1/11>)

ภูมิคุ้มกันวิทยาและการติดเชื้อเอชไอวี

สาเหตุหลักของการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีคือการทำลาย CD4+ T cells ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัสเอชไอวี จนทำให้ภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอลง เป็นผลให้ผู้ติดเชื้อเอชไอวีไวต่อการติดเชื้อฉวยโอกาสและเสียชีวิตในที่สุด การศึกษาภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์ แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานมากกว่า 10 ปี พบว่าทั้ง cellular immune response และ humoral immune response ต่อเอชไอวี ในผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้มีบทบาทในการควบคุมการดำเนินของโรค [17-20]

มีรายงานการศึกษาทางด้าน cellular immune response ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์ แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานมากกว่า 10 ปี ถึงประสิทธิภาพของ CD8+ T cells และ CD4+ Th cells ในการป้องกันการดำเนินของโรค กลไกในการทำลาย

ไวรัสเอชไอวีของ CD8+ T cells มี 2 วิธี คือ non-cytolytic pathway และ cytolytic pathway สำหรับ non-cytolytic pathway นั้นได้มีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2529 โดย Walker และคณะ ซึ่งพบว่า CD8+ T cells สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีได้ [21] ซึ่งต่อมานักวิจัยกลุ่มนี้ได้ค้นพบว่าการยับยั้งนี้เกิดจากโปรตีนที่หลั่งมาจาก CD8+ T cells [22] ในปี 2538 Cocchi และคณะได้รายงานว่ามีโปรตีนเหล่านี้คือ Regulated on activation, normal T expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammation protein 1 α (MIP-1 α), macrophage inflammation protein 1 β (MIP-1 β) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับ CCR5 ทำให้สามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ R5 ไวรัสได้ [23] นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ อีกหลายชนิดที่หลั่งมาจาก CD8+ T cells และมีคุณสมบัติยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ R5 ไวรัสได้เช่นกัน แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสารชนิดใด [24, 25] ส่วนกลไกทางด้าน cytolytic pathway นั้น เกิดจากการที่โปรตีนของไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อปรากฏบนผิวเซลล์ร่วมกับ MHC class I และไปจับกับ T cell receptor บนผิว cytotoxic CD8+ T cells เกิดการหลั่ง protease และ perforin ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการ lysis และ เชื้อไวรัสถูกทำลาย

บทบาทของ CD4+ T helper cells ในการควบคุม การผลิตแอนติบอดี การรักษาระดับ CD8+ T cells การกระตุ้น macrophage และ natural killer cells ทำให้ CD4+ T cells มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเอชไอวีเช่นกัน การศึกษาในหลอดทดลองพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์ แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานมากกว่า 10 ปี มี proliferative response ของ HIV-specific CD4+ T cells สูง ส่วนในผู้ที่ติดเชื้อทั่วๆ ไปนั้นพบว่า proliferative response ของ p24 specific CD4+ T cells มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับ Gag-specific cytotoxic CD8+ T cells แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณไวรัสในพลาสมา [26] ในปี 2536 Cleriri และ Shearer ได้ตั้งสมมุติฐานของการเกิด Th/Th2 switch ในระหว่างการติดเชื้อเอชไอวีเนื่องจากได้ศึกษาพบว่าผู้ที่สัมผัสเชื้อแต่ไม่ติดเชื้อมีการตอบสนองของ Th1 สูงและลักษณะที่สำคัญในการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีคือมีการผลิต IL-2 และ IFN- γ ลดลงแต่มีการผลิต IL-4 และ IL-10 สูงขึ้น [27]

HIV specific humoral immune response ก็มีบทบาทในการทำลายเชื้อเอชไอวีเช่นกัน มีรายงานว่าภายหลังการติดเชื้อประมาณ 2-3 สัปดาห์ สามารถตรวจพบ anti-gp120 anti-gp41 anti-p24 และ anti-p17 ในพลาสมาของผู้ติดเชื้อเอชไอวี [28-30] ผู้ติดเชื้อเอชไอวีสามารถสร้างทั้ง Neutralizing antibody (Nab) และ non-neutralizing antibodies (non-Nab) ต่อไวรัสเอชไอวี Nab จะมีความจำเพาะต่อ gp120 และ gp41 ทำให้สามารถป้องกันการจับกันระหว่างไวรัสเอชไอวีกับ receptor บนผิวเซลล์ ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส และ การเกิด membrane fusion ระหว่างไวรัสเอชไอวีกับเซลล์ อย่างไรก็ตามพบว่าหลังการติดเชื้อเอชไอวีจะสามารถตรวจพบ

CD8+ T cells ได้ก่อน NAb ซึ่ง การเกิด Nab ต้องใช้เวลามากถึง 6-12 สัปดาห์ และระดับ titre ของ NAb ก็ค่อนข้างต่ำ และความสามารถในการ neutralize ไวรัสก็ค่อนข้างจำกัด นอกจากนี้ ไวรัสยังมีหลายกลไกในการหลบหนี Nab เช่นการเกิด glycosylation บน envelope หรือ การมี hypervariable loop ที่ยื่นมาจาก core ทำให้ไปปกปิดส่วน conserved region, CD4 binding site และ coreceptor binding site มีผลทำให้ Nab ไม่สามารถเข้าไปจับกับโครงสร้างเหล่านี้ของ ไวรัสได้ [31, 32]

SNP ของยีน cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรครายหลังการติดเชื้อเอชไอวี

ความสำคัญของ cytokine ใน adaptive immunity ทำให้ cytokine มีความเกี่ยวข้องกับ กลไกการเกิดพยาธิวิทยาของโรค cytokines ที่หลั่งออกมาจากเซลล์จะมีบทบาททำให้เกิดการส่ง สัญญาณระหว่างเซลล์ทำให้มีผลต่อสิ่งแวดล้อมโดยรอบ ในภาวะปกติจะไม่มีการสร้าง cytokine แต่จะมีการสร้างเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นเท่านั้น โดยการสร้าง cytokine จะถูกควบคุมโดยขบวนการ transcription ของยีนนั้นๆ ดังนั้นยีนที่ควบคุมการสร้าง cytokine จึงน่าจะมีความสัมพันธ์กับ พยาธิวิทยาของการติดเชื้อเอชไอวี

Tumor necrosis factor α (TNF- α) เป็น cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและมีความสำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันวิทยา ปริมาณของ TNF- α ที่มากเกินไปทำให้เกิด พยาธิสภาพที่แย่งในโรคติดเชื้อหลายๆ ชนิดรวมถึงเอชไอวีด้วย มีรายงานว่า Peripheral blood monocytes จากผู้ป่วยเอดส์มีการผลิต TNF- α ในปริมาณที่สูงกว่าคนปกติมาก [33] นอกจากนี้ ยังพบว่า TNF- α ยังทำให้มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสใน infected cell lines และ primary blood monocyte-derived macrophages (MDMs) จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีด้วย [34-36] มีหลายการศึกษาที่ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการผลิต TNF- α และความหลากหลายของยีน *TNFA* โดยความ หลากหลายที่มีการศึกษามากที่สุดคือการแทนที่ของ A ด้วย G ที่ตำแหน่ง -308 ของยีน *TNFA* แม้ว่าจะมีการรายงานถึงความสัมพันธ์ของ *TNFA* -308A กับอัตราการ transcription ของยีน *TNFA* ที่เพิ่มขึ้น [37] แต่ผลการศึกษานี้ก็กลับไม่ได้รับการยืนยันในการศึกษาอื่นๆ [38-40] [41] นอกจากนี้ปริมาณของ TNF- α ในหลอดทดลองหลังการกระตุ้นเซลล์ของผู้ที่มี อัลลีล A ก็ ให้ผลที่แตกต่างกันเช่นกัน ในขณะที่บางการศึกษาพบปริมาณของ TNF- α สูง ในผู้ที่มี อัลลีล A [42, 43] แต่บางการศึกษากลับไม่พบความสัมพันธ์นี้ [40, 41] การศึกษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวีใน กลุ่ม Dutch, African-Americans และ Hispanic พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ณ ตำแหน่ง -376, -308, -238 และ -163 ของยีน *TNFA* และ การดำเนินโรครายหลังการติดเชื้อเอชไอวี [44, 45] ส่วนการศึกษาใน American Caucasians ที่ติดเชื้อเอชไอวีใน Centers for Disease Control

and Prevention (CDC) และ National Institutes of Health (NIH) cohorts พบว่ามีความสัมพันธ์เพียงเล็กน้อยระหว่าง *TNF α -308A* และการดำเนินโรคซ้ำ และเมื่อทำการศึกษาใน Multicenter AIDS Cohort Study (MACS) ซึ่งเป็น cohort ที่ใหญ่ขึ้นกลับไม่พบความสัมพันธ์นี้ [46]

Interferon- γ (IFN- γ) เป็น cytokine ที่มีหลายบทบาท โดยมีบทบาทช่วยการเจริญเติบโตของ Th1 เซลล์ และช่วยป้องกันการติดเชื้อโรคที่เจริญเติบโตภายในเซลล์รวมทั้งเอชไอวี นอกจากนี้ยังมีความสามารถสูงในการกระตุ้น monocytes และไปยับยั้งการแบ่งตัวของ Th2 เซลล์ [47] อีกด้วย ในโรคติดเชื้อเอชไอวีนั้นพบว่า ผู้ติดเชื้อที่มี CD4+ T cells สูงกว่า 400 เซลล์/ไมโครลิตร มีปริมาณ IFN- γ mRNA ใน peripheral blood lymphocytes สูงกว่าในผู้ติดเชื้อที่มี CD4+ T cells ต่ำกว่า 400 เซลล์/ไมโครลิตร [48] และปริมาณ IFN- γ สูงก็มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคซ้ำและทำให้ผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น [49] ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่พบการดำเนินของโรคมียังมีจำนวน p24-specific IFN- γ - IL-2+ CD4 T cells สูงกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินโรคซ้ำ [50] และ IFN- γ ยังสามารถป้องกันการเกิด apoptosis ของ CD4+ T cells ได้ อีกด้วย [51] นอกจากผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแล้ว IFN- γ ยังมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีด้วย การศึกษาใน monocyte culture ที่เติม IFN- γ ลงไป 1 วันก่อนเติมไวรัสเอชไอวี และหลังจากนั้นก็เติม IFN- γ ลงไปใน monocyte culture ทุกวัน พบว่าไม่สามารถตรวจพบเอ็นไซม์ Reverse transcriptase ใน supernatant และ ไม่สามารถตรวจพบ RNA และ DNA ของไวรัสเอชไอวีใน monocyte lysate [52] การศึกษาต่อมาพบว่า IFN- γ สามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสโดยการลดการแสดงออกของ CD4 โมเลกุล [53] CCR5 และ CXCR4 บนผิวเซลล์ [54] อย่างไรก็ตามบางการศึกษากลับพบว่า IFN- γ สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของไวรัสใน monocyte derived macrophage, promonocytic cell line และ mononuclear phagocyte ในหลอดทดลองได้ [55, 56] จากการศึกษาที่ Pravica และคณะได้พบความสัมพันธ์ระหว่าง 12 CA repeats ใน intron แรกของยีน *IFN γ* กับการผลิต IFN- γ ที่มากขึ้นในหลอดทดลอง [57] และต่อมาได้พบว่า 12 CA repeats นี้มีความสัมพันธ์กับ T nucleotide ที่ตำแหน่ง +874 ของยีน *IFN γ* [58] ดังนั้น *IFN γ +874T* จึงน่าจะมีส่วนทำให้มีการผลิต IFN- γ มากขึ้นและมีผลต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีด้วย แต่การศึกษาที่ผ่านกลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง *IFN γ +874T* กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี

Interleukin-4 (IL-4) เป็น cytokine ที่มีผลต่อเซลล์หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกัน IL-4 ช่วยในการเจริญเติบโตของ naïve T cells ไปเป็น Th2 cells ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในระบบ humoral immune response และทำให้เกิดการผลิตแอนติบอดี นอกจากนี้ยังไปควบคุม Th1 cells โดยการยับยั้งการผลิต IFN- γ [59] และยับยั้งการ phagocytosis และการทำลายเชื้อโรคภายในเซลล์ของ

macrophage อีกด้วย [60] ภายหลังจากติดเชื้อเอชไอวีพบว่า T cell clone จาก CD4+ memory cells ผลิต IL-4 และ IL-5 ในระดับที่สูงขึ้น ในขณะที่ผลิต IFN- γ ในระดับที่ลดลง [61] และเมื่อนำ T cell clone มากระตุ้นด้วย phytohemagglutinin ก็พบว่ามีการสร้าง IL-4 ใน culture supernatant เพิ่มมากขึ้นด้วย [61] นอกจากนี้ยังพบว่า IL-4 mRNA ใน peripheral blood mononuclear cells ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน [62] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า IL-4 มีคุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณของ CXCR4 และลดปริมาณ CCR5 บนผิวเซลล์ของ primary CD4+ T cells ทำให้ X4 ไวรัสสามารถเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น และ R5 ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง [63] จากรายงานความสัมพันธ์ของ T อัลลีล ณ ตำแหน่ง -589 ของยีน *IL4* ที่มีผลไปเพิ่ม promoter activity ในการ transcription ของยีน *IL4* [64] ทำให้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ SNPs นี้กับการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีในหลายการศึกษา บางการศึกษาพบว่า *IL4*-589T มีความสัมพันธ์กับการเร่งให้เกิด virus switching จาก R5 เป็น X4 ซึ่งอาจมีผลทำให้การดำเนินของโรคให้เร็วขึ้น [65] อย่างไรก็ตามกลับพบว่าอัลลีลนี้มีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรคที่ช้าลงโดยการลดปริมาณไวรัสในกระแสเลือด [66] อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ๆ กลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลนี้กับการดำเนินของโรค [67-69]

Interleukin-10 (IL-10) เป็น cytokine ที่สามารถควบคุมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย IL-10 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Th2 ไซโตไคน์เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการผลิตไซโตไคน์จาก Th1 cells นอกจากนี้ IL-10 ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการแสดงออกของ MHC class I บน cytotoxic CD8+ T cells ทำให้ลดความสามารถในการ cytotoxic ของ cytotoxic CD8+ T cells อีกด้วย [70] มีหลายการศึกษาที่ได้แสดงถึงความสัมพันธ์ของ IL-10 กับการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี การศึกษาในกลุ่มประชากรชาวอินเดียพบว่าระดับของ IL-10 ในผู้ป่วยเอดส์มีปริมาณสูงกว่าในผู้ป่วยที่ไม่แสดงอาการ [71] การศึกษาในชาวอูกานดาพบว่าผู้ป่วยที่มี CD4+ T cells น้อยกว่า 200 เซลล์/ไมโครลิตร มีปริมาณของ HIV specific IL10+ CD8+ T cells สูงกว่าแต่มีความสามารถในการ lysis ต่ำกว่า ผู้ป่วยที่มี CD4+ T cells มากกว่า 200 เซลล์/ไมโครลิตรและยังพบว่าปริมาณของ HIV specific IL10+ CD8+ T cells ยังมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไวรัสเอชไอวีในพลาสมาของผู้ป่วยอีกด้วย [72] นอกจากนี้ IL-10 ยังมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีโดยตรงอีกด้วย โดยมีทั้งงานวิจัยที่รายงานว่า IL-10 มีผลทำให้ไวรัสเอชไอวีเพิ่มจำนวนมากขึ้น [73-75] และงานวิจัยที่รายงานว่า IL-10 สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวี [76, 77] จากการศึกษาที่พบว่า ปริมาณของ IL-10 นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของยีนในส่วนของ IL-10 promoter โดยพบว่า SNPs ณ ตำแหน่ง -1082, -819, -592 ของยีน *IL10* มีความสัมพันธ์กับการผลิต IL-10 โดย GCC, ACC และ ATA haplotype ของ SNPs เหล่านี้มีผลต่อการผลิต IL-10 สูง ปานกลาง และ ต่ำ ตามลำดับ [78] อย่างไรก็ตามการศึกษานี้

ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ณ ตำแหน่ง -1082, -819, -592 กับการดำเนินของโรค ภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี [79]

SNP ของยีน chemokine และ chemokine receptor ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคภายหลัง การติดเชื้อเอชไอวี

ในปี พ.ศ. 2529 ได้มีรายงานเป็นครั้งแรกว่า soluble factors จาก CD8+ T cells สามารถ ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีได้ [21] ซึ่งต่อมาในปี พ.ศ.2538 Cocchi และคณะได้ ทำการศึกษาพบว่า soluble factors ที่สำคัญที่ผลิตจาก CD8+ T cells และทำหน้าที่ในการยับยั้งการ เพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีนั่นคือ RANTES, MIP-1 α และ MIP-1 β [23] หลังจากนั้น 1 ปี ได้มี รายงานว่า receptor สำหรับโปรตีนเหล่านี้คือ CCR5 ซึ่งทำหน้าที่เป็น coreceptor สำหรับ M-tropic virus ในการเข้าสู่ host cell [80-84] และในปีเดียวกันนั้นเองได้มีรายงานว่าโปรตีน fusin ซึ่งต่อมา รู้จักกันในนามของ CXCR4 เป็น co-receptor ที่ช่วยในการเข้าสู่เซลล์ของ T-tropic virus [85] และ SDF-1 เป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสชนิดนี้ได้ [86, 87] จากคุณลักษณะของ การใช้ coreceptor ที่ต่างกันในการเข้าสู่เซลล์ของ M- และ T- tropic virus ทำให้มีการให้ชื่อใหม่ ของไวรัสทั้งสองชนิดนี้เป็น R5 และ X4 นอกจากนี้ไวรัสเอชไอวีจะใช้ coreceptor ทั้งสองชนิดนี้ใน การเข้าสู่ host cell แล้ว ไวรัสเอชไอวียังสามารถใช้ coreceptor อื่นในการเข้าสู่ host cell ได้อีกด้วย เช่น CCR2 CCR3 CCR8 และ CX3CR1 [82, 84, 88, 89] อย่างไรก็ตาม CCR5 และ CXCR4 ก็ยัง เป็น coreceptor หลักที่เชื้อไวรัสเอชไอวีใช้ในการเข้าสู่ host cell จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการ เปลี่ยนแปลงทางด้าน genetics ของยีน chemokine และ chemokine receptor ที่มีผลต่อการควบคุม การสร้างโปรตีน ทำให้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางด้าน genetics กับ การดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีกันอย่างกว้างขวาง

RANTES เป็นโปรตีนที่จับกับ CCR5 coreceptor โดยจับกับ loop ที่ 2 ของ CCR5 ที่ยื่น ออกมาบนผิวเซลล์ โปรตีนนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ R5 ไวรัส [90] การศึกษาที่ ผ่านมาพบว่าระดับของ RANTES จาก PBMCs ของผู้ป่วยที่นำมากระตุ้นด้วย PHA ในหลอด ทดลองมีความสัมพันธ์เชิงลบกับอัตราการดำเนินของโรคติดเชื้อเอชไอวี [91] และได้มีรายงาน ว่า CD8+ T cells จากผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีมานานแต่ไม่มีอาการสามารถหลั่ง RANTES ได้มากกว่าผู้ที่ มีอาการเอดส์ [92] ได้มีรายงานว่า RANTES-28G มีผลทำให้มีการ transcription ของยีน RANTES เพิ่ม มากขึ้น [93, 94] และมีความสัมพันธ์กับการลดลงของ CD4+ T cell ที่ซ้าลงในผู้ติดเชื้อเอชไอวีชาว ญี่ปุ่น [93] นอกจากนี้ยังพบว่า RANTES-28G สามารถป้องกันการดำเนินของโรคติดเชื้อเอชไอวี ในผู้หญิงไทย [8] อีกด้วย อย่างไรก็ตาม Zhao และคณะ กลับรายงาน ว่า RANTES-28G มีผลเร่งการ

ค่าเนินของโรค [95] และบางการศึกษาที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง RANTES-28G กับการดำเนินของโรค [94, 96, 97]

Stromal cell derived factor 1 (SDF1) เป็นโปรตีนที่จับกับ CXCR4 coreceptor และสามารถยับยั้งการเข้าสู่ CD4+ T cell ของ X4 ไวรัส [86, 98] การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก G ไป A ณ ตำแหน่ง 801 ซึ่งอยู่ในบริเวณ 3' UTR ของยีน SDF1 มีผลทำให้มีการแสดงออกของยีน SDF1 ที่สูงขึ้น มีผลทำให้การดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีช้าลง [99] นอกจากนั้นยังพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีจีโนไทป์เป็น AA หรือ GA จะมีอัตราการตายที่ต่ำกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีจีโนไทป์เป็น GG ดังนั้น A อัลลีล จึงน่าจะมีผลในการป้องกันการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี [100] อย่างไรก็ตามบทบาทหนึ่งของ A อัลลีลก็ไม่ได้รับการยืนยันในการศึกษาในกลุ่มประชากรอื่นๆ [101-105] นอกจากนั้นบางการศึกษากลับพบว่า A อัลลีลมีความสัมพันธ์กับการเร่งการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี [106-108]

CCR5 เป็น coreceptor หลักสำหรับเชื้อไวรัสเอชไอวีในการเข้าสู่ host cell ของ R5 ไวรัส การค้นพบ CCR5-Δ32 ในปี 2539 เป็นเหตุการณ์แรกๆ ที่แสดงให้เห็นถึงผลของอัลลีลที่สามารถยับยั้งการเข้าสู่ host cell ของไวรัสเอชไอวี [109] การศึกษาในชายรักร่วมเพศพบว่าผู้ที่มี A อัลลีล ณ ตำแหน่ง -59029 ของยีน CCR5 มีการดำเนินของโรคภายหลังการติดเชื้อเร็วกว่าผู้ที่มี G อัลลีล ณ ตำแหน่งนี้ [110] ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการศึกษา *in vitro* ที่พบว่า การแสดงออกของ CCR5 บนผิวเซลล์ของเซลล์ที่มี A อัลลีล มีปริมาณสูงกว่าเซลล์ที่มี G อัลลีล อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ในประชากรชาวอังกฤษกลับไม่พบความสัมพันธ์นี้ [102]

CCR2 เป็น coreceptor ที่ไวรัสเอชไอวีไม่ค่อยใช้ในการเข้าสู่ host cell ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงใดๆ บน coreceptor นี้จึงไม่น่าจะมีผลมากนักกับการดำเนินของโรคติดเชื้อเอชไอวี อย่างไรก็ตามกลับพบว่า การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์จาก G ไปเป็น A ณ ตำแหน่ง 190 ของยีน CCR2 ซึ่งมีผลทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก valine ไปเป็น isoleucine ณ ตำแหน่งที่ 64 ของโปรตีน CCR2 (CCR2-64I) มีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรคช้า [101, 104, 106, 111-115] ทั่วๆ ที่ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนนี้เป็นตำแหน่งที่ฝังอยู่ใน membrane ของเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงนี้ก็ไม่แสดงผลต่อการแสดงออกของ CCR2 หรือ CCR5 บนผิวเซลล์ [116, 117] อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของ SNP นี้กับการดำเนินของโรคช้าอาจเนื่องมาจากว่า CCR2-64I มักจะจับกับ CXCR4 ใน endoplasmic reticulum [118] ทำให้ปริมาณ CXCR4 บนผิวเซลล์ลดลง มีผลให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง อย่างไรก็ตามบางการศึกษากลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง CCR2-64I กับการดำเนินของโรคช้า [102, 119-122]

วิธีการดำเนินการวิจัย

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาและจริยธรรมการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันภัยอันตรายในการวิจัยกับมนุษย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อาสาสมัครในการวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย

1. กลุ่มควบคุมประกอบด้วยคนปกติจำนวน 9 คน ที่มีคุณสมบัติดังนี้

- มีสัญชาติและเชื้อชาติไทย
- มีสุขภาพแข็งแรง
- ไม่เคยเข้าร่วม โครงการทดลองวัคซีน
- ไม่ได้นอนในโรงพยาบาลในช่วง 3 เดือนก่อนการเข้าร่วมการศึกษานี้
- ถ้าเป็นผู้หญิงต้องไม่อยู่ในระหว่างตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- เข้าร่วมการศึกษาด้วยความสมัครใจ

อาสาสมัครคนปกติทุกคนจะถูกสัมภาษณ์และเจาะเลือดโดยพยาบาลประจำโครงการ

2. กลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เป็นส่วนหนึ่งของอาสาสมัครในโครงการวิจัยที่เคยดำเนินการในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 3 โครงการคือ

1. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายเชื้อเอชไอวี ในภาคเหนือของประเทศไทย ที่ได้ดำเนินการในปี พ.ศ. 2535-2541 โดยได้ทำการรับอาสาสมัครจำนวน 590 คู่ ที่มาบริจาคเลือด ณ ธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ สภากาชาดจังหวัดเชียงใหม่ และโรงพยาบาลศูนย์จังหวัดลำปาง
2. Survival of HIV-1 Male Blood Donors and Their Infected Partners in Northern Thailand (SSI) ซึ่งดำเนินการในปี พ.ศ. 2542-2543 โดยได้ศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตอยู่ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีในโครงการข้างต้น
3. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่กระจายเชื้อเอชไอวีในภาคเหนือของประเทศไทย-บทบาทของ host และ ไวรัสที่มีผลต่อการดำเนินของโรคของผู้ติดเชื้อเอชไอวี เกลด อี ที่ได้ดำเนินการในปี พ.ศ. 2543-2545 เป็นโครงการที่ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง SNP และการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ได้ใช้ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) หรือ PMNs แข็งที่เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส จำนวน 169, 38 และ 52 ตัวอย่างจากโครงการทั้งสามข้างต้น

การศึกษารายการแสดงออกของยีนได้ใช้ PBMCs ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวจำนวน 15 ตัวอย่างจากโครงการที่ 3 โดยจำแนกเป็น

1. ตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานจำนวน 8 รายโดยเป็นผู้ติดเชื้อที่มีสุขภาพแข็งแรงหรือผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการ มีค่า CD4 ก่อนข้างคงที่และมากกว่า 350 เซลล์/ม.ม.
2. ตัวอย่างจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินของโรคปกติ จำนวน 7 ราย โดยเป็นผู้ติดเชื้อที่มีค่า CD4 ลดลงอย่างต่อเนื่อง และ/หรือ มีอาการที่เกี่ยวข้องกับโรคเอดส์ภายใน 6-10 ปี

การเก็บตัวอย่าง

1. การเก็บ PBMCs นำตัวอย่างเลือดมาทำการเจือจาง ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 แล้วนำไป overlayer บน Ficoll-Hypaque และปั่นที่ 400 x g เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บชั้น PBMCs มาล้างด้วย RPMI 1640 (Invitrogen, CA, USA) 2 ครั้ง และ resuspend ใน Fetal bovine serum (FBV) (Invitrogen) ทำการนับและปรับจำนวนเซลล์ใน FBV ให้เป็น 10×10^6 เซลล์/ม.ล. จากนั้นนำเซลล์มาผสมกับ 20% DMSO/FBV ที่เย็น ในปริมาณที่เท่ากัน แล้วแบ่งใส่ cryovial ละ 1 มล. และนำ cryovials ใสลงใน isopropanol box นำไปแช่ที่ ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน แล้วย้ายไปใส่ในถังไนโตรเจนเหลว
2. การเก็บ PMNs เก็บ PMNs จากหลอดที่มี Ficoll-Hypaque แล้วใส่ Tris-HCl ลงไป 10 มล. นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และปั่นที่ 600 x g 10 นาที ถ้ามืดเลือดแดงยังคงตกไม่หมดให้ทำซ้ำอีกครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้เป็น 10×10^6 เซลล์/ม.ล. แบ่งใส่ microfuge ละ 0.5 ม.ล. เก็บไว้ใน ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส

การตรวจการติดเชื้อเอชไอวีและการตรวจนับประชากรย่อยของเซลล์เม็ดเลือดขาว

การตรวจการติดเชื้อเอชไอวีโดยใช้ ชุดตรวจ Vironostika® HIV Uni-Form II plus O (Organon Teknika) ถ้าผลการทดสอบเป็นบวกให้ทำการตรวจยืนยันด้วยการทำ Western blot (GENELAB® DIANOSTICS, Singapore) ส่วนการตรวจนับประชากรย่อยของเซลล์เม็ดเลือด

ขาวนั้นใช้ชุดตรวจ Simultest™ IMK-lymphocyte (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) โดยการ ใช้ชุดตรวจต่างๆ เหล่านี้ให้ทำตามข้อแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

การตรวจหา SNP ของยีน cytokine, chemokine และ chemokine receptor

1. การสกัด DNA

การสกัด DNA ได้ใช้ QIAamp® DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) ตามข้อแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

2. การตรวจ *TNF α* -308G/A, *IFNG*+874T/A, *IL4*-589C/T, *CCR5*-59029G/A, *CCR2*-V64I โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP)

วิธีการตรวจที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการปรับปรุงมาจากวิธีการของ McCarron และคณะ [123] โดยในการทดลองจะใช้ 2 หลอดทดลองต่อ 1 SNP หลอดแรกจะเป็นการตรวจหา wild type และหลอดที่ 2 จะเป็นการตรวจหา variant type ส่วนของ primer ที่ใช้ในการตรวจจะออกแบบโดยโปรแกรม Primer3 และลำดับของ HGH primer นั้นได้มาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ [124] การเพิ่มจำนวน DNA ทำในสารละลาย 10 ไมโครลิตร ที่ ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นดังนี้ 20 มิลลิโมลลาร์ Tris-HCL pH 8.4, 50 มิลลิโมลลาร์ KCl, 2.0 มิลลิโมลลาร์ MgCl₂ (Invitrogen, บลาซิล), 200 ไมโครโมลลาร์ deoxynucleotide triphosphate (dNTPs, NEW ENGLAND BioLabs® Inc., MA, สหรัฐอเมริกา), 2 ไมโครโมลลาร์ ของแต่ละ specific/common primers (ตารางที่ 1), 0.25 ไมโครโมลลาร์ ของแต่ละ HGH primers, 0.25 ยูนิต Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, บลาซิล) 25-50 นาโนกรัม genomic DNA จากนั้นนำไปขยายจำนวน DNA ในเครื่อง ABI 9700 thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, สหรัฐอเมริกา). โดยมี Cycling conditions คือ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, 20 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที, annealing temperature (Ta) ของแต่ละ SNP (ตารางที่ 2) 50 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 50 วินาที ตามด้วย 10 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, 62 องศาเซลเซียส 50 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที หลังจากนั้นนำ PCR products ไปผสมกับ 6x loading dye และนำไปทำ electrophoresed ด้วย 2% agarose หลังจากย้อมเจลด้วย 0.5 ไมโครกรัม/ม.ล. ethidium bromide นำเจลไปถ่ายรูปภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ตารางที่ 1 ชื่อ Primers และลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับการตรวจหา SNP โดยวิธี PCR-SSP

ชื่อ Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'
<i>TNFα</i> -308 Common (antisense)	TCT CGG TTT CTT CTC CAT CG
<i>TNFα</i> -308 G (sense)	ATA GGT TTT GAG GGG CAT GG
<i>TNFα</i> -308 A (sense)	ATA GGT TTT GAG GGG CAT GA
<i>IFNγ</i> +874 Common (antisense)	TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA
<i>IFNγ</i> +874 T (sense)	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT
<i>IFNγ</i> +874 A (sense)	TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA
<i>IL4</i> -589 Common (antisense)	AGT ACA GGT GGC ATC TTG GAA A
<i>IL4</i> -589 C (sense)	CTA AAC TTG GGA GAA CAT TGT C
<i>IL4</i> -589 T (sense)	CTA AAC TTG GGA GAA CAT TGT T
<i>CCR5</i> -59029 Common (sense)	TCC TGC CAC CTA TGT ATC TG
<i>CCR5</i> -59029 C (antisense)	GAC TTC ACA TTA ACC CTG TGC
<i>CCR5</i> -59029 T (antisense)	GAC TTC ACA TTA ACC CTG TGT
<i>CCR2</i> -64I Common (sense)	ATC TCG TTC TCG GTT TAT CAG
<i>CCR2</i> -64I C (antisense)	TTG CAG TTT ATT AAG ATG AGG AC
<i>CCR2</i> -64I T (antisense)	TTG CAG TTT ATT AAG ATG AGG AT
<i>HGH</i> -1 (sense)	GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA
<i>HGH</i> -2 (antisense)	TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

ตารางที่ 2 Primers และ annealing temperatures สำหรับการตรวจหา SNP โดยวิธี PCR-SSP

SNP	Primers สำหรับ หลอด wild type	Primers สำหรับ หลอด variant type	Ta (°C)
<i>TNFα</i> -308G/A	<i>TNFα</i> -308 Common (antisense) <i>TNFα</i> -308 G (sense)	<i>TNFα</i> -308 Common (antisense) <i>TNFα</i> -308 A (sense)	66
<i>IFNγ</i> +874T/A	<i>IFNγ</i> +874 Common (antisense) <i>IFNγ</i> +874 T (sense)	<i>IFNγ</i> +874 Common (antisense) <i>IFNγ</i> +874 A (sense)	60
<i>IL4</i> -589C/T	<i>IL4</i> -589 Common (antisense) <i>IL4</i> -589 C (sense)	<i>IL4</i> -589 Common (antisense) <i>IL4</i> -589 T (sense)	63
<i>CCR5</i> -59029G/A	<i>CCR5</i> -59029 Common (sense) <i>CCR5</i> -59029 C (antisense)	<i>CCR5</i> -59029 Common (sense) <i>CCR5</i> -59029 T (antisense)	65
<i>CCR2</i> -64I	<i>CCR2</i> -64I Common (sense) <i>CCR2</i> -64I C (antisense)	<i>CCR2</i> -64I Common (sense) <i>CCR2</i> -64I T (antisense)	64

3. การตรวจ *IL10*-1082G/A, *IL10*-819C/T, *IL10*-592C/A โดยวิธี multiplex PCR-SSP

Primer สำหรับใช้ในการทดลองนี้แสดงใน ตารางที่ 3 การทดลองนี้ทำในหลอดทดลอง 2 หลอด หลอดแรกประกอบด้วย *IL10*-1082 G, *IL10*-819 T, *IL10*-592 C และ *IL10* Common ส่วนหลอดที่ 2 ประกอบด้วย *IL10*-1082 A, *IL10*-819 C, *IL10*-592 A และ *IL10* Common ส่วนสารตั้งต้นอื่นๆ มีความเข้มข้นเช่นเดียวกับวิธี PCR-SSP จากนั้นนำไปขยายจำนวน DNA ในเครื่อง ABI 9700 thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, สหรัฐอเมริกา). โดยมี Cycling conditions คือ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที, 66 องศาเซลเซียส 50 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 80 วินาที ตามด้วย 10 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, 62 องศาเซลเซียส 50 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที หลังจากนั้นจึงตรวจหา PCR products โดยนำสารละลายไปผสมกับ 6x loading dye และนำไปทำ electrophoresed ด้วย 2% agarose หลังจากย้อมเจลด้วย 0.5 ไมโครกรัม/ม.ล. ethidium bromide นำเจลไปถ่ายภาพภายใต้แสงอุลตราไวโอเรต

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และ annealing temperatures สำหรับ multiplex PCR-SSP

ชื่อ Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-3'	Ta (°C)
<i>IL10</i> Common (antisense)	CAA GCC CCT GAT GTG TAG A	66
<i>IL10-1082</i> G (sense)	CTA CTA AGG CTT CTT TGG GAG	
<i>IL10-1082</i> A (sense)	ACT ACT AAG GCT TCT TTG GGA A	
<i>IL10-819</i> C (sense)	CCC TTG TAC AGG TGA TGT AAC	
<i>IL10-819</i> T (sense)	ACC CTT GTA CAG GTG ATG TAA T	
<i>IL10-592</i> C (sense)	CTG TGA CCC CGC CTG TC	
<i>IL10-592</i> A (sense)	CTG TGA CCC CGC CTG TA	
<i>HGH-1</i> (sense)	GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA	62
<i>HGH-2</i> (antisense)	TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C	

4. การตรวจ *SDF1-3'*A โดยวิธี tetra-primer PCR-SSP

วิธี tetra-primer PCR-SSP เป็นวิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีของ Ye และคณะ [125] การทดลองนี้ได้ใช้โปรแกรม primer 3 ในการออกแบบ primer ข้อดีของวิธีนี้คือการใช้ 2 primer ในการตรวจหา 2 อัลลีล ใน 1 หลอดทดลอง โดย PCR product ขนาด 364 bp แสดงว่าเป็น A อัลลีล ส่วน PCR product ขนาด 495 bp แสดงว่าเป็น G อัลลีล การเพิ่มจำนวน DNA ทำในสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.4, 50 มิลลิโมลาร์ KCl, 2.0 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 200 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละ deoxynucleotide triphosphate, 0.15 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละ forward outer primer และ reverse outer primer (ตารางที่ 4), 0.2 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละ forward inner primer และ reverse inner primer, 0.25 หน่วย Platinum[®] Taq DNA Polymerase และ 25-50 นาโนกรัม genomic DNA. จากนั้นนำไปใส่ลงในเครื่อง ABI 9700 thermal Cycler (Applied Biosystems) ที่ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที, 64.5 องศาเซลเซียส 50 วินาที and 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที

ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นจึงตรวจหา PCR product ตามวิธีการข้างต้น
ที่กล่าวไว้ในการทำ PCR-SSP

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer และ annealing temperatures สำหรับ tetra-primer PCR-SSP

Primer name	Primer sequence 5'-3'	Ta (°C)
Forward inner primer (A allele)	CAT CCA CAT GGG AGC CA	64.5
Reverse inner primer (G allele)	CCA GAA GAG GCA GAC CC	
Forward outer primer	GCTCTGAAACCAGTGTTAGG	
Reverse outer primer	ACATTGGTCACAGAGGAGGA	

5. การตรวจ RANTES-28C/G โดยวิธีการหาลำดับเบส

การหาลำดับเบสในส่วนของ promoter ของยีน RANTES ที่รวมตำแหน่ง -28 ทำได้โดยใช้ forward primer 5'-AGA TGA GAG AGC AGT GAG G-3' และ the reverse primer 5'- GTA GCA ATG AGG ATG ACA G -3' ที่ออกแบบโดยโปรแกรม Primer 3 โดยนำ primer นี้ไปใส่ในหลอดทดลองพร้อมกับสารตั้งต้นต่างๆ คือ 20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 8.4, 50 มิลลิโมลาร์ KCl, 2.0 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 200 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละ deoxynucleotide triphosphate, 0.5 ไมโครโมลาร์ ของ specific primers, 1.25 ยูนิต Platinum[®] Taq DNA Polymerase และ 125-250 นาโนกรัม DNA จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ในเครื่อง ABI 9700 thermal Cycler ที่ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที, 40 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55.5 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจหา PCR product ขนาด 626 bp ตามวิธีการข้างต้นที่กล่าวไว้ในการทำ PCR-SSP และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) ตามคำแนะนำของบริษัท แล้วจึงส่ง PCR product ที่ทำให้บริสุทธิ์นี้ไปทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ BigDye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) และเครื่อง ABI 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems) ณ ตำแหน่งที่เกิด SNP ถ้าพบ 2 peaks แสดงว่าตัวอย่างนั้นมาจากผู้ที่เป็น heterozygote แต่ถ้าพบเพียง 1 peak แสดงว่าตัวอย่างนั้นมาจากผู้ที่เป็น homozygote

6. การวิเคราะห์ข้อมูล คำนวณความถี่ของแต่ละอัลลีลโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความถี่ของแต่ละอัลลีล} = (h+2N)/2N$$

โดยที่ h = จำนวนของ heterozygous genotype

H = จำนวนของ homozygous variant genotype

N = จำนวนประชากรทั้งหมด

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงในสัดส่วนของแต่ละ genotype ในแต่ละรุ่นของประชากรโดยใช้ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) และวิเคราะห์ผล SNPs ของ cytokine, chemokine และ chemokine receptor ต่อการมีชีวิตรอดระหว่างแต่ละ genotypic group โดย การสร้าง Kaplan-Meier survival curve พร้อมทำการเปรียบเทียบโดยใช้ log-rank test หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตระหว่างแต่ละ genotypic group ด้วย Cox proportional hazards model

การตรวจการแสดงผลของยีน

1. การกระตุ้น PBMCs ด้วยแอนติเจน

นำ PBMCs ที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวมาล้างด้วย RPMI 1640 และเลี้ยงไว้ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 1 คืนจากนั้นนำ PBMCs มาล้างด้วย RPMI 1640 และปรับความเข้มข้นให้เป็น 2x10⁶ เซลล์/มล. ใน complete medium (10% FBS in RPMI 1640) ใส่ PBMCs ใส่ลงใน 24 well plate หลุมละ 2x10⁶ เซลล์ และเติม LPS หรือ P24 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 และ 2 ไมโครกรัม/มล. ส่วนหลุมควบคุมให้เติมเฉพาะ RPMI 1640 จากนั้นนำ plate ไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

2. การสกัด RNA

ใช้ RNeasy[®] Plus Mini Kit (QIAGEN) ในการสกัด RNA จาก PBMCs โดยทำตามข้อแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

3. Reverse transcription (RT)

การสร้าง cDNA จาก mRNA ได้ใช้ MultiScribe[™] Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) โดยทำการทดลองในสารละลาย 10 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย 1x TaqMan RT Buffer, 5.5 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 500 ไมโครโมลาร์ ของแต่ละ dNTPs, 2.5 ไมโครโมลาร์ Random Hexamers, 4 ยูนิต RNase inhibitor, 12.5 ยูนิต MultiScribe Reverse Transcriptase และ 20 นาโนกรัม template RNA จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง ABI

9700 thermal Cycler ที่ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที, 48 องศาเซลเซียส 30 นาที และ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วจึงเก็บ cDNA ไว้ใน ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

4. การหาปริมาณ cDNA ด้วยวิธี Real-time quantitative PCR

หาปริมาณ cDNA ของ IL-10 และ GAPDH ในสารละลาย 25 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 1x probe และ primer และ 2.0 นาโนกรัม reverse-transcribed RNA โดยติดฉลาก probes ด้วย FAM (Florescein amidite) ณ ตำแหน่งปลาย 5' และ MGB (Minor groove binding) ณ ตำแหน่งปลาย 3' โดยมี ตัวอย่างที่เป็น negative PCR control และ positive PCR control ที่ทราบ cycle threshold (Ct, the cycle number at which the detected fluorescence exceeds the threshold) รวมอยู่ด้วยในทุกการทดลอง จากนั้นนำไปทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ด้วยเครื่อง ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) ที่ 50 องศาเซลเซียส 2 นาที 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ตามด้วย 40 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที ในระหว่างการเพิ่มจำนวน DNA ค่า Ct ของแต่ละตัวอย่างจะนำมาคำนวณหาปริมาณ IL-10 mRNA ใน PBMCs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS หรือ P24 antigen เมื่อเทียบกับ PBMCs ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นตามสูตรดังนี้

$$\text{The relative increase (fold increase)} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{โดยที่ } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ stimulated culture} - \Delta Ct \text{ unstimulated culture}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ IL-10} - Ct \text{ GAPDH}$$

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ Kruskal-Wallis Test ในการวิเคราะห์ว่าผู้ที่มีการดำเนินของโรคแตกต่างกันจะมี การแสดงออกของยีนแตกต่างกันหรือไม่

ผลการทดลอง

คุณลักษณะของกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อเอชไอวีในวันที่เข้าร่วมโครงการ

อาสาสมัครที่ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 259 คน ติดเชื้อมาจากการมีเพศสัมพันธ์กับคู่นอนต่างเพศและเป็นผู้ที่ไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสมาก่อน ในวันที่เข้าร่วมโครงการมีอาสาสมัครที่เป็นเพศชายจำนวน 166 คน (64.1%) มีอายุโดยเฉลี่ย 28.8 ปี ติดเชื้อมาแล้วโดยเฉลี่ย 8.29 ปี และมีค่า CD4+ และ CD8+ T cells โดยเฉลี่ย 372 และ 961 เซลล์/mm³ ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของจำนวนไวรัสเท่ากับ 20,783 copies/มล. โดยมีอาสาสมัคร 3 คน มีค่า viral load ต่ำกว่า 50 copies/มล. (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 คุณลักษณะของกลุ่มประชากรที่ติดเชื้อเอชไอวีในวันที่เข้าร่วมโครงการ

คุณลักษณะ	จำนวน
เพศชาย (%)	166 (64.1)
อายุ, mean years (SD)	28.8 (6.6)
ระยะเวลาที่ติดเชื้อ, mean years (SD)	8.29 (3.28)
จำนวน CD4+ T cell , median cells/ μ l (IQR) ^a	372 (223.2-551.8)
จำนวน CD8+ T cell, median cells/ μ l (IQR) ^a	961 (694-1,392)
จำนวนไวรัส, median copies/ml (IQR) ^{b,c}	20,783 (6,262-64,025)

^a 256 คน

^b 247 คน

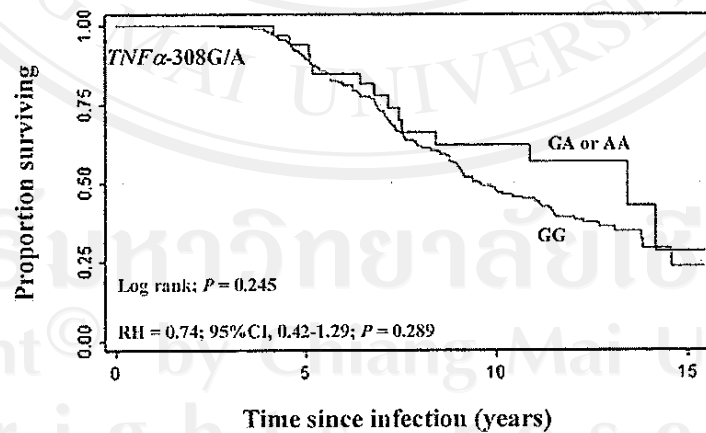
^c ค่าที่น้อยกว่า 50 copies/ม.ล. ถือว่าเป็น 49 copies/ม.ล.

ความถี่ของ genotype, อัลลีล และ haplotype และ ความสัมพันธ์ของ ยีน cytokine, chemokine และ chemokine receptorกับการมีชีวิตรอดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี

การตรวจหา genotype ของ *TNFA*-308G/A (ตารางที่ 6) พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่วนใหญ่มี GG genotype (86.9%) สัดส่วนของ genotype เป็นไปตามสมมูล Hardy-Weinberg ความถี่ของ อัลลีล A มีค่าเท่ากับ 6.8% เนื่องจากพบผู้ที่ เป็น AA genotype เพียง 1 คน จึงได้รวมผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี AA genotype เข้ากับผู้ที่มี GA genotype แล้วทำการเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี AA หรือ GA genotype กับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี GG genotype (รูปที่ 5) พบว่าการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ *TNFA*-308G/A

Genotype	N (%)	P value (HWE)	Allele	N (%)
GG	225 (86.9)	0.86	G	483 (93.2)
GA	33 (12.7)		A	35 (6.8)
AA	1 (0.4)			

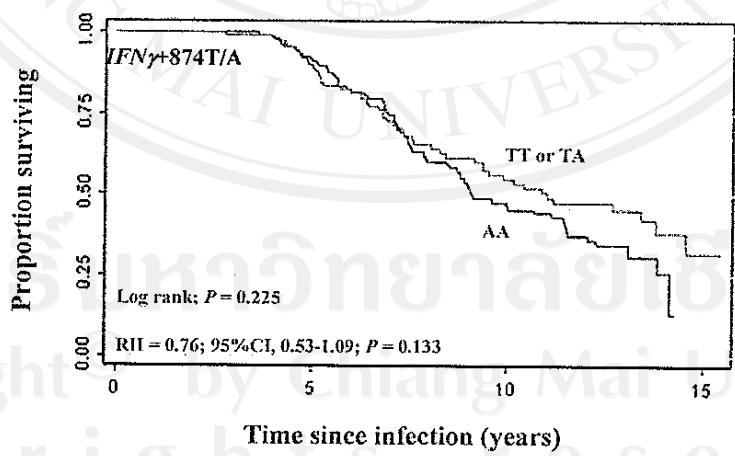


รูปที่ 5 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *TNFA*-308 GG genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *TNFA*-308 GA หรือ AA genotype

ตารางที่ 7 แสดงความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ *IFN γ 4874T/A* ผลการศึกษาพบว่า 7.0% ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีมี genotype เป็น TT 38.2% ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีมี genotype เป็น TA และ 7.0 % ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีมี genotype เป็น AA โดยสัดส่วนของ genotype เป็นไปตามสมการ Hardy-Weinberg ความถี่ของอัลลีล T เท่ากับ 26.1% เนื่องจากมีผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี genotype เป็น TT อยู่เพียง 18 คน ดังนั้นจึงรวมผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้เข้ากับผู้ติดเชื้อที่มี genotype เป็น TA แล้วทำการเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวี 2 กลุ่มนี้ (รูปที่ 6) พบว่าการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี TT หรือ TA genotype มีแนวโน้มต่ำกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี AA genotype (RH,0.76; CI, 0.53-1.03; $P = 0.133$)

ตารางที่ 7 ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ *IFN γ 4874T/A*

Genotype	N (%)	<i>P</i> value (HWE)	Allele	N (%)
TT	18 (7.0)	0.90	T	135 (26.1)
TA	99 (38.2)		A	383 (73.9)
AA	142 (54.8)			

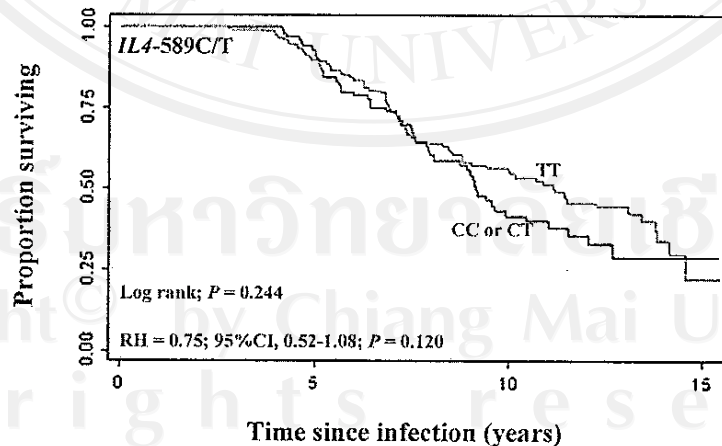


รูปที่ 6 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *IFN γ 4874* TT หรือ TA genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *IFN γ 4874* AA genotype

การตรวจ SNP ณ ตำแหน่ง -589 ของยีน *IL4-589* พบว่าความถี่ของ CC, CT และ TT genotype ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคือ 5.8%, 33.6% และ 60.6% ตามลำดับ สัดส่วนของ genotype เป็นไปตามสมมติฐาน Hardy-Weinberg ความถี่ของ อัลลีล T เท่ากับ 77.4% (ตารางที่ 8) จากผลการศึกษาที่พบผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี CC genotype เพียง 15 คน จึงได้รวมผู้ติดเชื้อ genotype นี้เข้ากับผู้ติดเชื้อที่มี CT genotype แล้วจึงทำการเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้ง 2 กลุ่ม (รูปที่ 7) พบว่าการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี TT genotype มีแนวโน้มต่ำกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี CC หรือ CT genotype (RH,0.75; CI, 0.52-1.08; $P = 0.120$)

ตารางที่ 8 ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ *IL4-589C/T*

Genotype	N (%)	P value (HWE)	Allele	N (%)
CC	15 (5.8)	0.52	C	117 (22.6)
CT	87 (33.6)		T	401 (77.4)
TT	157 (60.6)			



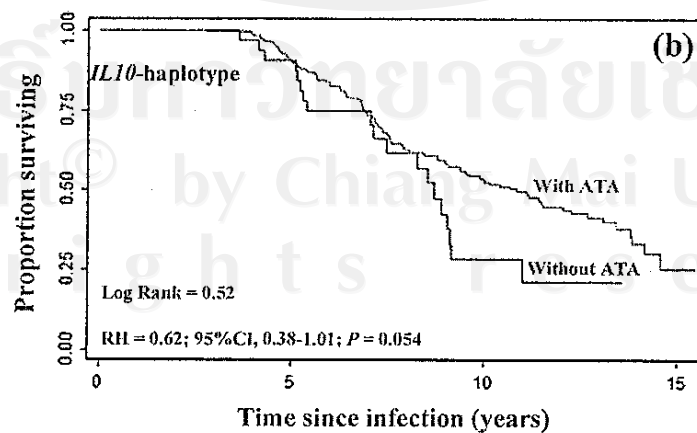
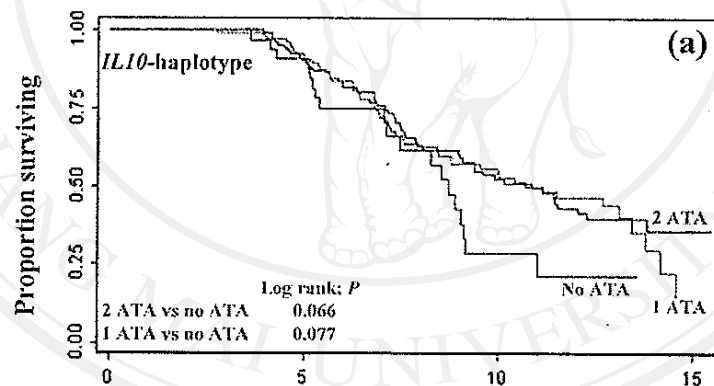
รูปที่ 7 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *IL4-589* TT เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *IL4-589* CC หรือ CT genotype

Genotype ของ *IL10* promoter ณ ตำแหน่ง -1082 มีความถี่ของ GG, GA และ AA genotype เป็น 0.8%, 11.6% และ 87.6% ตามลำดับ โดยสัดส่วนของ genotype เป็นไปตามสมการ Hardy-Weinberg ค่าความถี่ของ อัลลีล A เท่ากับ 93.4% SNP ของ *IL10*-592 และ -819 มีลักษณะของ linkage disequilibrium คือถ้าตำแหน่ง -592 เป็นอัลลีล C ตำแหน่ง -819 จะเป็นอัลลีล C และถ้า ตำแหน่ง -592 เป็นอัลลีล A ตำแหน่ง -819 จะเป็นอัลลีล T เสมอ ดังนั้นจึงพบว่า ณ ตำแหน่ง -592 (-819) ความถี่ ของ CC genotype มีค่าเท่ากับ 12.7% ความถี่ของ CA (CT) genotype มีค่าเท่ากับ 44.4% และความถี่ของ AA (TT) genotype มีค่าเท่ากับ 42.9% สัดส่วนของ genotype เป็นไปตามสมการ Hardy-Weinberg ความถี่ของอัลลีล A (T) มีค่าเท่ากับ 65.1% นอกจากนี้ SNP ทั้งสามตำแหน่งยังสามารถจำแนกได้เป็น 3 haplotype คือ GCC, ACC และ ATA ทำให้ได้ความถี่ของ GCC/GCC, GCC/ACC, GCC/ATA, ACC/ACC, ACC/ATA และ ATA/ATA เป็น 0.8%, 2.7%, 8.9%, 9.3% และ 35.5% ตามลำดับ และมีความถี่ของ GCC, ACC และ ATA haplotype เป็น 6.6%, 28.4% และ 65.0% ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ความถี่ของ genotype อัลลีล และ haplotype ของ *IL10* promoter

Genotype	N (%)	P value (HWE)	Allele or haplotype	N (%)
<i>IL10</i> -1082				
GG	2 (0.8)	0.37	G	34 (6.6)
GA	30 (11.6)		A	484 (93.4)
AA	227 (87.6)			
<i>IL10</i> -592 (-819)				
CC	33 (12.7)	0.84	C	181 (34.9)
CA (CT)	115 (44.4)		A (T)	337 (65.1)
AA (TT)	111 (42.9)			
<i>IL10</i> -1082, -819, -592				
GCC/GCC	2 (0.8)		GCC	34 (6.6)
GCC/ACC	7 (2.7)		ACC	147 (28.4)
GCC/ATA	23 (8.9)		ATA	337 (65.0)
ACC/ACC	24 (9.3)			
ACC/ATA	92 (35.5)			
ATA/ATA	111 (42.8)			

ในการศึกษาความสัมพันธ์ของ *IL10* promoter SNP กับ การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ได้แบ่งผู้ติดเชื้อเอชไอวีออกเป็น 3 กลุ่ม คือผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี 2, 1 และ ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มี ATA haplotype รูปที่ 10 แสดงว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี 2 และ 1 ATA haplotype มีแนวโน้มที่จะมีชีวิตรอดดีกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มี ATA haplotype ($P = 0.066$ และ $P = 0.077$, ตามลำดับ) และพบว่าผู้ติดเชื้อที่มี 2 และ 1 ATA haplotype ยังเสี่ยงต่อการเสียชีวิตน้อยกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มี ATA haplotype (RH, 0.61; 95% CI, 0.36-1.03; $P = 0.065$ และ RH, 0.62; 95% CI, 0.37-1.05; $P = 0.073$, ตามลำดับ) เนื่องจากอัตราการเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี 2 และ 1 ATA haplotype ไม่แตกต่างกัน (RH, 0.95; 95%CI, 0.64-1.39; $P = 0.773$) จึงได้รวมผู้ติดเชื้อ 2 กลุ่มนี้เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี ATA haplotype แล้วนำไปเปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มี ATA haplotype ซึ่งพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี ATA haplotype มีแนวโน้มที่จะมีชีวิตรอดที่ดีกว่า ($P = 0.052$) และมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตน้อยกว่า (RH, 0.62; 95% CI, 0.38-1.01; $P = 0.054$) ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มี ATA haplotype

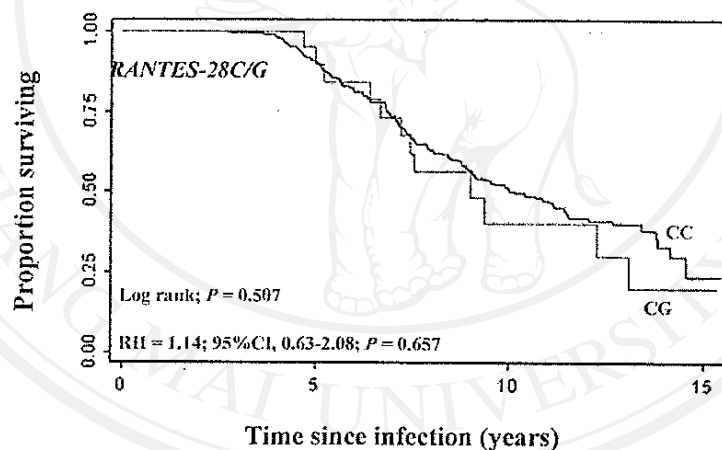


รูปที่ 8 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี 2, 1 และ ไม่มี ATA haplotype (a) และในผู้ติดเชื้อที่มี และ ไม่มี ATA haplotype (b)

ในการตรวจ genotype ของ *RANTES*-28 SNP พบว่าไม่มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี GG genotype ความถี่ของ CC และ CG genotype มีค่าเท่ากับ 91.1% และ 8.9% ตามลำดับ โดยสัดส่วนของ genotype เป็นไปตามสมการ Hardy-Weinberg ค่าความถี่ของอัลลีล G เท่ากับ 4.4% (ตารางที่ 10) การเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้ง 2 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 11)

ตารางที่ 10 ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ *RANTES*-28 SNP

Genotype	N (%)	P value (HWE)	Allele	N (%)
CC	236 (91.1)	0.45	C	495 (95.6)
CG	23 (8.9)		G	23 (4.4)

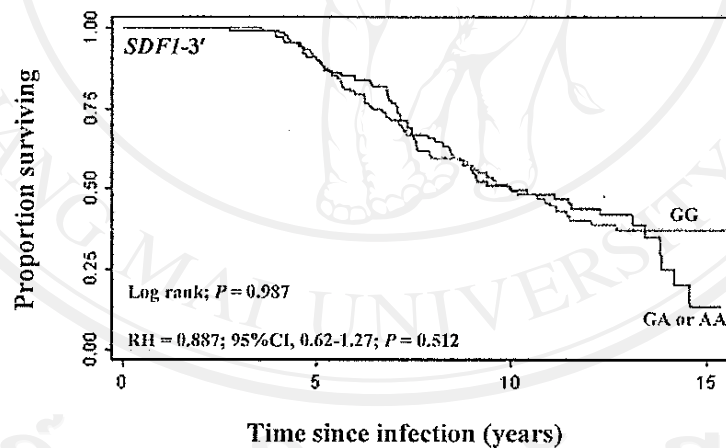


รูปที่ 9 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *RANTES*-28 CC genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *RANTES*-28 CG genotype

ตารางที่ 11 แสดงความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ SNP ณ ตำแหน่ง -28 ของยีน *SDF1* ความถี่ของ GG, GA และ AA genotype คือ 54.8%, 37.5% และ 7.7% ตามลำดับ สัดส่วนของแต่ละ genotype เป็นไปตามสมการ Hardy-Weinberg ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 26.4% ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี AA genotype มีเพียง 22 คนจึงรวมผู้ติดเชื้อเอชไอวีกลุ่มนี้เข้ากับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี GA genotype ผลการเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 12)

ตารางที่ 11 ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ *SDF1*-3' SNP

Genotype	N (%)	P value (HWE)	Allele	N (%)
GG	142 (54.8)	0.55	G	381 (73.6)
GA	97 (37.5)		A	137 (26.4)
AA	20 (7.7)			

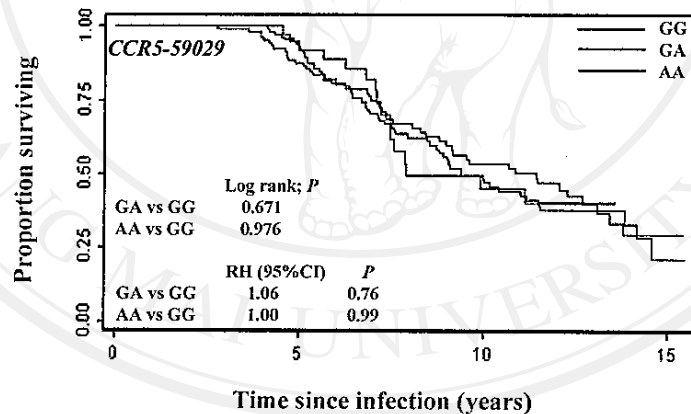


รูปที่ 10 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *SDF1*-3' GG genotype เปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี *SDF1*-3' GA หรือ AA genotype

Genotype GG, GA และ AA ณ ตำแหน่ง -59029 ของยีน *CCR5* คือ 40.2%, 45.2% และ 14.7% ตามลำดับ สัดส่วนนี้เป็นไปตามสมการ Hardy-Weinberg ความถี่ของอัลลีล A มีค่าเท่ากับ 37.3% (ตารางที่ 12) เมื่อเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งสามกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 13)

ตารางที่ 12 ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ *CCR5*-59029G/A

Genotype	N (%)	P value (HWE)	Allele	N (%)
GG	104 (40.2)	0.59	G	325 (62.7)
GA	117 (45.2)		A	193 (37.3)
AA	38 (14.7)			



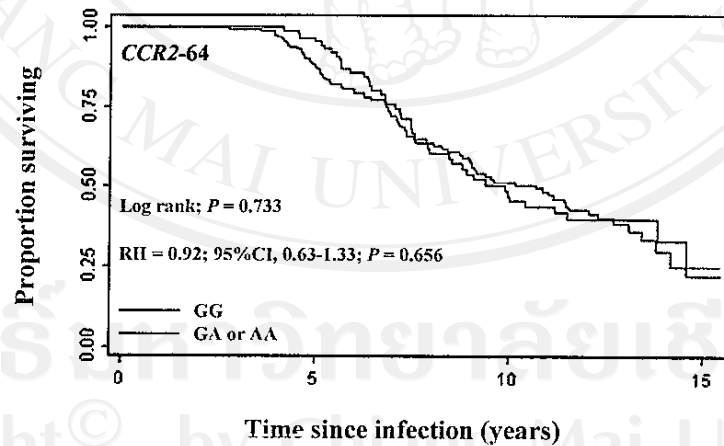
รูปที่ 11 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อที่มี *CCR5*-59029 GG, GA และ AA genotype

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 13 แสดงความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของยีน CCR2 ณ ตำแหน่ง 190 ความถี่ของ GG, GA และ AA genotype คือ 64.5%, 30.9% และ 4.6% ตามลำดับ สัดส่วนของแต่ละ genotype เป็นไปตามสมการ Hardy-Weinberg ความถี่ของอัลลีล A เท่ากับ 20.1% พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี AA genotype จำนวน 12 คนจึงรวมผู้ติดเชื้อเอชไอวีกลุ่มนี้เข้ากับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี GA genotype ผลการเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดและความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตระหว่างผู้ติดเชื้อสองกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 14)

ตารางที่ 13 ความถี่ของ genotype และ อัลลีล ของ CCR2-64 SNP

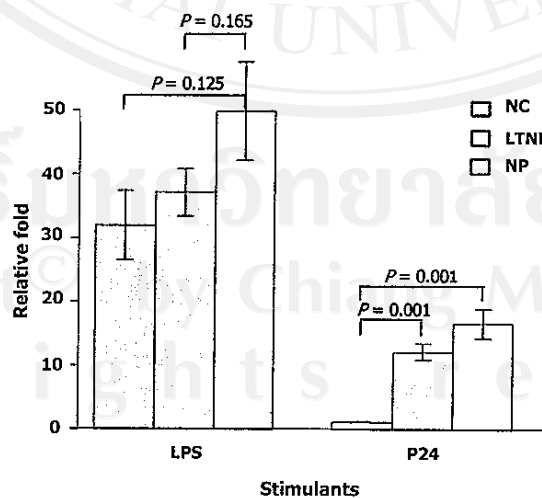
Genotype	N (%)	P value (HWE)	Allele	N (%)
GG	167 (64.5)	0.54	G	414 (79.9)
GA	80 (30.9)		A	104 (20.1)
AA	12 (4.6)			



รูปที่ 12 Kaplan-Meier survival curves ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีเอชไอวีที่มี CCR5-59029 GG, GA และ AA genotype

การแสดงออกของยีน *IL10* และการดำเนินของโรคติดเชื้อเอชไอวี

จากผลการทดลองที่พบว่า ATA haplotype ของ *IL10*-1082, -819 และ -592 มีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีซ้ำ จึงได้ทำการทดลองเพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีน *IL10* ในกลุ่มคนปกติจำนวน 9 คน ผู้ติดเชื้อเอชไอวีไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานจำนวน 8 คน และ ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินโรคปกติจำนวน 7 คน รูปที่ 15 แสดงการแสดงผลของการแสดงออกของ *IL10* โดยการวัดปริมาณ *IL10* mRNA ของ PBMCs ภายใต้การกระตุ้นด้วย LPS และ P24 antigen โดยเปรียบเทียบกับ PBMCs ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ผลการทดลองพบว่า การในการกระตุ้นด้วย LPS การแสดงออกของ mRNA ของผู้ติดเชื้อที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานไม่แตกต่างจากคนปกติ แต่การแสดงออกของ *IL10* mRNA ของผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีปกติมีแนวโน้มสูงกว่าคนปกติ ($P = 0.125$) และ ผู้ที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานาน ($P = 0.165$) ส่วนภายใต้การกระตุ้นด้วย P24 antigen พบว่า การแสดงออกของยีน *IL10* จากผู้ติดเชื้อที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานและผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีปกติ มีค่าสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.001$) แต่การแสดงออกของยีน *IL10* ในผู้ติดเชื้อที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานและผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีปกติไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 13 การแสดงออกของ *IL10* โดยการวัดปริมาณ *IL10* mRNA ใน PBMCs ภายใต้การกระตุ้นด้วย LPS และ P24 antigen โดยเปรียบเทียบกับ PBMCs ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

วิจารณ์ผลการทดลอง

ถึงแม้ว่าจะมีหลายการศึกษาที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs ของยีน cytokine, chemokine และ chemokine receptor กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี แต่ผลจากการศึกษาเหล่านี้พบว่าบางการศึกษาก็ให้ผลเหมือนกัน บางการศึกษาก็ให้ผลแตกต่างกัน ทำให้ยังไม่สามารถหาข้อสรุปที่แน่นอนได้ นอกจากนั้นส่วนใหญ่แล้ว การศึกษาเหล่านี้เป็นการศึกษาในบริเวณที่มีการระบาดของไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ B และ C มีการศึกษาในบริเวณที่มีการระบาดของเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ CRF01_AE ซึ่งระบาดในประเทศไทยเพียง 2 การศึกษาเท่านั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาในภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งมีการระบาดของเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ CRF01_AE

การรายงานปริมาณ TNF- α ที่มีปริมาณสูงในผู้ติดเชื้อเอชไอวี [33] และความสามารถของ TNF- α ในการกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นของเชื้อเอชไอวี [34-36] ในการศึกษาก่อนหน้านี้ทำให้มีสมมุติฐานว่า TNF α -308G/A ซึ่งเคยมีรายงานว่าส่งผลต่อการผลิต TNF- α น่าจะมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี แต่ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง TNF α -308G/A กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาใน African-Americans, Hispanic และ Caucasians [44-46] การไม่พบความสัมพันธ์นี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจาก SNP ที่ตำแหน่ง-308 ของยีน TNF α ไม่มีผลต่อการผลิต TNF- α ดังที่ได้มีการรายงานในการศึกษาก่อนหน้านี้ [38-41]

ความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณ IFN- γ กับการมีพยากรณ์โรคที่ดีภายหลังการติดเชื้อเอชไอวี [48, 49] และ ความสามารถของ IFN- γ ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวี [52-54, 126] ในการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงให้เห็นถึงบทบาทที่สำคัญของ IFN- γ ต่อการดำเนินของโรคติดเชื้อเอชไอวี ดังนั้นจึงมีสมมุติฐานว่า IFN γ -4874T ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการผลิต IFN- γ ที่เพิ่มขึ้นช่วยให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า IFN γ -4874T มีแนวโน้มที่จะทำให้ความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตลดลงในประชากรภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัลลีลนี้มีแนวโน้มทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับสมมุติฐาน อย่างไรก็ตามผลการทดลองในครั้งนี้ให้ผลแตกต่างจากผลการทดลองของ Wang และคณะที่ทำการทดลองในประชากร African-Americans และ Hispanic [45] ความแตกต่างนี้อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างในวิธีการที่ใช้ในวัดการดำเนินของโรค โดยการทดลองของ Wang ใช้การติดตามการเปลี่ยนแปลงของ CD4+ T cells และปริมาณไวรัสเอชไอวีในช่วงเวลา 1 ปี แต่การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้การเสียชีวิตของผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งใช้ระยะเวลาการติดตามประมาณ 10-12

ปี ซึ่งระยะเวลาการติดตามเพียง 1 ปีของ Wang อาจเป็นระยะเวลาที่สั้นเกินกว่าจะแสดงให้เห็นถึงผลของ T อลติลต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี

IL-4 เป็น Th2 cytokine ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ Th1 cytokine ได้ทำให้คาดว่า IL-4 อาจเป็นตัวเร่งให้มีการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีเป็นไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า IL-4 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ R5 ไวรัสในแมคโครฟาจ และ T cells [63, 127] แต่ช่วยส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของ X4 ไวรัสใน T cells [63, 128] ทำให้คาดว่า IL-4 จะมีผลให้มีการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าในระยะแรกของการติดเชื้อซึ่งพบ R5 ไวรัส และจะมีผลให้มีการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีเร็วในระยะหลังของการติดเชื้อซึ่งพบ X4 ไวรัส ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะทำนายผลของ IL-4 ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ผลการศึกษาในครั้งนี้ได้พบว่า *IL4-589T* มีแนวโน้มที่จะทำให้ความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตลดลงในประชากรภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อัลลิลนี้มีแนวโน้มทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า *IL4-589T* สามารถป้องกันการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีได้ [8] [45, 66, 129]

IL-10 เป็นไซโตไคน์ที่มีผลต่อทั้งภูมิคุ้มกันและการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวี มีรายงานว่า IL-10 มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี โดยพบว่า IL-10 มีปริมาณคงที่ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานาน แต่มีปริมาณสูงขึ้นในผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคปกติ [130] ผู้ติดเชื้อที่มีอาการของโรคเอดส์มี ปริมาณ IL-10 และ จำนวนของ IL-10+ CD8+ T cells สูง แต่ความสามารถของเซลล์นี้ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อต่ำ [71, 72] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า IL-10 สามารถยับยั้ง HIV-1 specific CD8+ T cells ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อได้อีกด้วย [131] การศึกษาผลของ IL-10 ต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสเอชไอวีในบางการศึกษาพบว่า IL-10 ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส [76, 77] ในขณะที่บางการศึกษากลับพบว่า IL-10 ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของไวรัส [73-75] จากผลการศึกษาเหล่านี้ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่า IL-10 มีผลต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีอย่างไร จากการศึกษาที่พบว่า ATA haplotype ของ IL10-1082, -819 และ -592 มีความสัมพันธ์กับการผลิต IL-10 ในปริมาณที่ต่ำ ทำให้คาดว่า ATA haplotypyr น่าจะมีผลต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ในการศึกษาที่เราพบว่าผู้ติดเชื้อที่มี ATA haplotype มีแนวโน้มสูงที่จะมีชีวิตรอดดีกว่าและมีแนวโน้มที่จะเสี่ยงต่อการเสียชีวิตต่ำกว่าผู้ติดเชื้อที่ไม่มี ATA haplotype การที่ ATA haplotype มีแนวโน้มสูงที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง อาจมีสาเหตุเนื่องมาจาก ATA haplotype มีความสัมพันธ์กับการผลิต IL-10 ได้น้อย เพื่อที่จะพิสูจน์ว่า ปริมาณ IL-10 ต่ำมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคที่ช้าลง การศึกษานี้จึงได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *IL10* ระหว่างผู้ติดเชื้อที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานกับผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคปกติโดยการวัด mRNA ใน

PBMCs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS และ P24 ผลการทดลองพบว่าหลังจากกระตุ้น PBMCs ด้วย LPS ปริมาณ mRNA ใน PBMCs ผู้ติดเชื้อที่ไม่มีการดำเนินไปสู่อาการของโรคเอดส์แม้จะมีการติดเชื้อเป็นเวลานานมีแนวโน้มที่จะมีค่าต่ำกว่าปริมาณ mRNA ใน PBMCs ในผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคปกติ

RANTES เป็น chemokine ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ R5 virus ได้ ดังนั้น นิวคลีโอไทด์ G ณ ตำแหน่ง -28 ในบริเวณ promoter ของ ยีน RANTES ซึ่งมีผลทำให้การทำงานของ promoter สูงขึ้น [93] [94] จึงน่าจะมีผลทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง RANTES-28G กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาในกลุ่มประชากรอื่น ได้แก่ Caucasians, European Americans, African American และ สเปน [94, 96, 97] อย่างไรก็ตาม การศึกษาในประชากรชาวญี่ปุ่นพบว่า RANTES-28G มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีที่ช้าลง [93] แต่การศึกษาในประชากรชาวจีนกลับพบว่า RANTES-28G มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีที่เร็วขึ้น [95] ผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากความถี่ของ G อัลลีลที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร โดยพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลนี้กับการดำเนินโรคช้ามักพบในประชากรที่มีความถี่ของอัลลีลอยู่ระหว่าง 8.9-15.5% ในขณะที่การไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง อัลลีลนี้กับการดำเนินโรคจะพบในกลุ่มประชากรที่มีความถี่ของอัลลีลอยู่ระหว่าง 0.4-4.4 ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าผลของ G อัลลีล ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีอาจไม่สามารถตรวจพบได้ในประชากรที่มีความถี่ของ G อัลลีลต่ำ

SDF1 เป็น chemokine เพียงตัวเดียวที่สามารถจับกับ CXCR4 receptor จึงเป็น chemokine ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ X4ไวรัส ได้ เนื่องจาก SDF1-3'A มีความสัมพันธ์กับการผลิต SDF1 ที่สูงขึ้น จึงทำให้คาดว่า SDF1-3'A น่าจะมีผลทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง แต่การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง SDF1-3'A กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี อย่างไรก็ตามผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าบางการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลนี้กับการดำเนินโรคแต่บางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์นี้ ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากความแตกต่างในการจัดกลุ่มของ genotype การศึกษาที่พบความสัมพันธ์นี้เป็นการเปรียบเทียบระหว่าง GG, GA และ AA genotype ในขณะที่การศึกษาที่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ได้มีการรวม GA และ AA genotype ไว้ในกลุ่มเดียวกัน (เนื่องจากความถี่ของ AA genotype ในกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษานี้ต่ำมาก) แล้วนำไปเปรียบเทียบกับ GG genotype ซึ่งการรวม GA และ AA genotype นี้อาจมีผลทำให้ไม่สามารถตรวจพบความสัมพันธ์ระหว่าง SDF1-3'A กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี

CCR5 เป็น chemokine receptor ที่ไวรัสเอชไอวี ใช้ในการเข้าสู่ host cell การเปลี่ยนแปลงทาง genetic ของยีน CCR5 ที่มีผลต่อการแสดงออกของ CCR5 จึงน่าจะมีผลต่อการดำเนินโรคติดเชื้อ

เชื้อเอชไอวี จากการศึกษาที่พบว่า A อัลลิล ณ ตำแหน่ง -59029 ของยีน CCR5 มีผลทำให้มีการแสดงออกของยีนสูงกว่า G อัลลิล [110] ทำให้คาดว่า A อัลลิล จะมีผลทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีเร็วขึ้น แต่การศึกษาในครั้งนี้กลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง CCR5-59029 กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาโดย Easterbrook และคณะ [102] แต่ต่างจากการศึกษาโดย McDermott และคณะ [110] ความแตกต่างของการศึกษาเหล่านี้ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาโดยพบว่าการศึกษาในครั้งนี้และการศึกษาของ Easternbrook เป็นการศึกษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อที่เป็น seroprevalent แต่การศึกษาโดย McDermott เป็นการศึกษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อที่เป็น seroconverter ซึ่งการศึกษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อที่เป็น seroprevalent มีข้อด้อยคือส่วนใหญ่แล้วผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคเร็วมักจะเสียชีวิตไปตั้งแต่ระยะแรกๆ ของการติดเชื้อ ทำให้ประชากรที่ใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่จะเป็นผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินโรคช้าและผู้ติดเชื้อที่ไม่มีการดำเนินของโรค ดังนั้นสัดส่วนของประชากรแต่ละกลุ่มจึงไม่ได้เป็นตัวแทนที่แท้จริงของกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด

SNP ณ ตำแหน่งที่ 190 ของยีน CCR2 ที่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก valine ไปเป็น isoleucine ณ ตำแหน่งที่ 64 ของ transmembrane domain แรกมักชอบที่จะจับกับ CXCR4 ได้เป็น dimer molecule บนผิวของ host cell ซึ่งอาจมีผลทำให้จำนวน CXCR4 มีปริมาณลดลง และส่งผลให้ X4 ไวรัสเพิ่มจำนวนได้น้อยลง ดังนั้นจึงมีการตั้งสมมุติฐานว่า CCR2-64I น่าจะมีผลทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง แต่การศึกษาในครั้งนี้กลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง CCR2-64I กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าบางการศึกษาก็ไม่พบความนี้เช่นกัน [103, 113-115, 120-122, 133] แต่บางการศึกษาก็พบว่า CCR2-64I มีผลทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง [Smith, 1997 #79] จากการสังเกตพบว่า CCR2-64I มีผลทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลงเมื่อศึกษาในกลุ่มประชากรที่มากกว่า 300 คน แต่ไม่พบความสัมพันธ์เมื่อศึกษาในกลุ่มประชากรที่น้อยกว่า 300 คน ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าจำนวนประชากรที่น้อยในการศึกษานี้อาจทำให้ไม่สามารถแสดงให้เห็นผลของ CCR2-64I ในการทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวีช้าลง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจหา SNPs ณ ตำแหน่ง -308 ของยีน *TNFC*, +874 ของยีน *IFN*, -589 ของยีน *IL4*, -1082, -819, -592 ของยีน *IL10*, 59029 ของยีน *CCR5*, 190 ของยีน *CCR2*, -28 ของยีน *RANTES* และ 801 ของยีน *SDF1* ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 259 คนที่ได้รับเชื้อจากการมีเพศสัมพันธ์กับคู่นอนต่างเพศ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ CRF01_AE ความถี่ของ genotype และ haplotype ของแต่ละยีนในประชากรกลุ่มนี้สรุปได้ดัง ตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ความถี่ของ genotype และ haplotype ของแต่ละยีนในประชากรภาคเหนือของประเทศไทย

Allele or haplotype	Frequencies (%)
<i>TNF</i> -308A	6.8
<i>IFN</i> +874T	26.1
<i>IL4</i> -589T	77.4
<i>IL10</i> -1082A	93.4
<i>IL10</i> -592A (-819T)	65.1
ATA haplotype of <i>IL10</i> -1082 -819 -592	65.0
<i>RANTES</i> -28G	4.4
<i>SDF1</i> -3'A	26.4
<i>CCR5</i> -59029A	37.3
<i>CCR2</i> -64I	20.1

ในการวิเคราะห์ผลของ SNPs เหล่านี้ ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 พบว่า SNPs ของยีน cytokine ทุกตัว มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ยกเว้น SNP ของยีน *TNFC* โดยพบว่า ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีแนวโน้มสูงที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง ความสัมพันธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาหาปริมาณ *IL-10* mRNA ที่ผลิตจาก PBMCs หลังจากการกระตุ้นด้วย LPS พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินของโรคช้า มีแนวโน้มที่จะสร้าง *IL-10* mRNA ต่ำกว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการดำเนินของโรคปกติ แสดงว่า แนวโน้มของ ATA haplotype ในการทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง อาจจะเป็นผลมาจากการผลิต

IL-10 mRNA ในปริมาณที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า *IL4-589T* อัลลิล และ *IFN γ +874T* อัลลิล มีแนวโน้มที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง สำหรับ SNPs ของยีน chemokine และ chemokine receptor นั้นไม่พบความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีแนวโน้มมากที่สุดในการทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง ตามด้วย *IL4-589T* และ *IFN γ +874T* อัลลิล ตามลำดับ

การศึกษาที่พบว่า ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีแนวโน้มสูงและ *IL4-589T* และ *IFN γ +874T* อัลลิล มีแนวโน้มในระดับหนึ่งที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลงนี้อาจช่วยในการพยากรณ์การดำเนินโรคภายหลังการติดเชื้อเอชไอวีเพื่อที่แพทย์จะได้ใช้ในการวางแผนและปรับปรุงการรักษาให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. UNAIDS. 2008 Report on the global AIDS epidemic: Executive summary. In. Geneva; 2008:1-36.
2. Phanuphak P, Lochareernkul C, Panmuong W, Wilde H. A report of three cases of AIDS in Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1985,3:195-199.
3. National AIDS Prevention and Alleviation Committee. Thailand-UNGASS Country Progress Report In. Bangkok, Thailand; 2008:1-107.
4. WHO. HIV/AIDS in the South-East Asia region. In. New Delhi: WHO Regional Office for South-East Asia; 2007:1-54.
5. Kawichai S, Celentano DD, Vongchak T, Beyrer C, Suriyanon V, Razak MH, *et al.* HIV voluntary counseling and testing and HIV incidence in male injecting drug users in northern Thailand: evidence of an urgent need for HIV prevention. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,41:186-193.
6. Punpanich W, Ungchusak K, Detels R. Thailand's response to the HIV epidemic: yesterday, today, and tomorrow. *AIDS Educ Prev* 2004,16:119-136.
7. Nguyen L, Li M, Chaowanachan T, Hu DJ, Vanichseni S, Mock PA, *et al.* CCR5 promoter human haplogroups associated with HIV-1 disease progression in Thai injection drug users. *Aids* 2004,18:1327-1333.
8. Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, *et al.* Protective effects of IL4-589T and RANTES-28G on HIV-1 disease progression in infected Thai females. *Aids* 2006,20:189-196.
9. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998,8:1229-1231.
10. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, *et al.* A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001,409:928-933.
11. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998,280:1077-1082.

12. Lai E, Riley J, Purvis I, Roses A. A 4-Mb high-density single nucleotide polymorphism-based map around human APOE. *Genomics* 1998,54:31-38.
13. Harding RM, Fullerton SM, Griffiths RC, Bond J, Cox MJ, Schneider JA, *et al.* Archaic African and Asian lineages in the genetic ancestry of modern humans. *Am J Hum Genet* 1997,60:772-789.
14. Nickerson DA, Taylor SL, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, Stengard J, *et al.* DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet* 1998,19:233-240.
15. Li WH, Sadler LA. Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 1991,129:513-523.
16. Piatak M, Jr., Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, *et al.* High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993,259:1749-1754.
17. Binley JM, Jin X, Huang Y, Zhang L, Cao Y, Ho DD, Moore JP. Persistent antibody responses but declining cytotoxic T-lymphocyte responses to multiple human immunodeficiency virus type 1 antigens in a long-term nonprogressing individual with a defective p17 proviral sequence and no detectable viral RNA expression. *J Virol* 1998,72:3472-3474.
18. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans SI, Feinberg MB, *et al.* Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996,12:585-592.
19. 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. *J Immunol* 1996,156:2616-2623.
20. Harrer E, Harrer T, Barbosa P, Feinberg M, Johnson RP, Buchbinder S, Walker BD. Recognition of the highly conserved YMDD region in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes from an asymptomatic long-term nonprogressor. *J Infect Dis* 1996,173:476-479.

21. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986,234:1563-1566.
22. Walker CM, Levy JA. A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication. *Immunology* 1989,66:628-630.
23. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995,270:1811-1815.
24. Mackewicz CE, Blackbourn DJ, Levy JA. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,92:2308-2312.
25. Yang OO, Walker BD. CD8+ cells in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: cytolytic and noncytolytic inhibition of viral replication. *Adv Immunol* 1997,66:273-311.
26. Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, Colbert DS, Jones NG, *et al.* Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999,73:6715-6720.
27. Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993,14:107-111.
28. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003,100:4144-4149.
29. 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* 1997,176:924-932.
30. Pellegrin I, Legrand E, Neau D, Bonot P, Masquelier B, Pellegrin JL, *et al.* Kinetics of appearance of neutralizing antibodies in 12 patients with primary or recent HIV-1 infection and relationship with plasma and cellular viral loads. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996,11:438-447.

31. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 1998,393:705-711.
32. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 1998,280:1884-1888.
33. Wright SC, Jewett A, Mitsuyasu R, Bonavida B. Spontaneous cytotoxicity and tumor necrosis factor production by peripheral blood monocytes from AIDS patients. *J Immunol* 1988,141:99-104.
34. Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989,86:2365-2368.
35. Mellors JW, Griffith BP, Ortiz MA, Landry ML, Ryan JL. Tumor necrosis factor-alpha/cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis* 1991,163:78-82.
36. Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989,86:5974-5978.
37. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997,94:3195-3199.
38. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 1995,46:32-41.
39. Stuber F, Udalova IA, Book M, Drutskaya LN, Kuprash DV, Turetskaya RL, et al. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 1995,46:42-50.
40. Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1995,12:127-133.

41. Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, *et al.* TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997,72:149-153.
42. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, *et al.* Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996,43:456-463.
43. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, *et al.* Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998,113:401-406.
44. Brinkman BM, Keet IP, Miedema F, Verweij CL, Klein MR. Polymorphisms within the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human immunodeficiency virus type 1-seropositive persons. *J Infect Dis* 1997,175:188-190.
45. Wang C, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Douglas SD, Mytilineos J, *et al.* Cytokine and chemokine gene polymorphisms among ethnically diverse North Americans with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004,35:446-454.
46. Knuchel MC, Spira TJ, Neumann AU, Xiao L, Rudolph DL, Phair J, *et al.* Analysis of a biallelic polymorphism in the tumor necrosis factor alpha promoter and HIV type 1 disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998,14:305-309.
47. Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 1988,168:543-558.
48. Diaz-Mitoma F, Kumar A, Karimi S, Kryworuchko M, Daftarian MP, Creery WD, *et al.* Expression of IL-10, IL-4 and interferon-gamma in unstimulated and mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from HIV-seropositive patients. *Clin Exp Immunol* 1995,102:31-39.
49. Ullum H, Cozzi Lepri A, Bendtzen K, Victor J, Gotzsche PC, Phillips AN, *et al.* Low production of interferon gamma is related to disease progression in HIV infection: evidence from a cohort of 347 HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997,13:1039-1046.

50. Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* 2002,169:6376-6385.
51. Clerici M, Sarin A, Berzofsky JA, Landay AL, Kessler HA, Hashemi F, *et al.* Antigen-stimulated apoptotic T-cell death in HIV infection is selective for CD4+ T cells, modulated by cytokines and effected by lymphotoxin. *Aids* 1996,10:603-611.
52. Fan SX, Turpin JA, Aronovitz JR, Meltzer MS. Interferon-gamma protects primary monocytes against infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Leukoc Biol* 1994,56:362-368.
53. Dhawan S, Heredia A, Wahl LM, Epstein JS, Meltzer MS, Hewlett IK. Interferon-gamma-induced downregulation of CD4 inhibits the entry of human immunodeficiency virus type-1 in primary monocytes. *Pathobiology* 1995,63:93-99.
54. Creery D, Weiss W, Lim WT, Aziz Z, Angel JB, Kumar A. Down-regulation of CXCR-4 and CCR-5 expression by interferon-gamma is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency virus (HIV) replication but not HIV entry into human monocytes. *Clin Exp Immunol* 2004,137:156-165.
55. Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen IS. Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 1988,241:1673-1675.
56. Biswas P, Poli G, Kinter AL, Justement JS, Stanley SK, Maury WJ, *et al.* Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells. *J Exp Med* 1992,176:739-750.
57. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, Hajeer A, Sinnott PJ, Hutchinson IV. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999,26:1-3.
58. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute

- correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000,61:863-866.
59. Peleman R, Wu J, Fargeas C, Delespesse G. Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J Exp Med* 1989,170:1751-1756.
 60. Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 1993,23:1034-1038.
 61. Meyaard L, Otto SA, Keet IP, van Lier RA, Miedema F. Changes in cytokine secretion patterns of CD4+ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1994,84:4262-4268.
 62. Altfeld M, Addo MM, Kreuzer KA, Rockstroh JK, Dumoulin FL, Schliefer K, *et al.* T(H)1 to T(H)2 shift of cytokines in peripheral blood of HIV-infected patients is detectable by reverse transcriptase polymerase chain reaction but not by enzyme-linked immunosorbent assay under nonstimulated conditions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000,23:287-294.
 63. Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, Pavlakis GN. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998,95:8886-8891.
 64. Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M, Borish L. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. *Clin Exp Allergy* 1995,25 Suppl 2:74-78; discussion 95-76.
 65. Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, *et al.* Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol* 2000,74:5452-5459.
 66. Nakayama EE, Meyer L, Iwamoto A, Persoz A, Nagai Y, Rouzioux C, *et al.* Protective effect of interleukin-4 -589T polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 disease progression: relationship with virus load. *J Infect Dis* 2002,185:1183-1186.

67. Modi WS, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Gomperts E, Phair J, *et al.* Haplotype diversity in the interleukin-4 gene is not associated with HIV-1 transmission and AIDS progression. *Immunogenetics* 2003,55:157-164.
68. Kwa D, van Rij RP, Boeser-Nunnink B, Vingerhoed J, Schuitemaker H. Association between an interleukin-4 promoter polymorphism and the acquisition of CXCR4 using HIV-1 variants. *Aids* 2003,17:981-985.
69. Singh KK, Hughes MD, Chen J, Spector SA. Lack of protective effects of interleukin-4 -589-C/T polymorphism against HIV-1-related disease progression and central nervous system impairment, in children. *J Infect Dis* 2004,189:587-592.
70. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, *et al.* Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med* 1994,180:2371-2376.
71. Ramalingam S, Kannangai R, Vijayakumar TS, Mathai D, Abraham OC, Subramanian S, *et al.* Subtype & cytokine profiles of HIV infected individuals from south India. *Indian J Med Res* 2005,121:226-234.
72. Elrefaei M, Barugahare B, Ssali F, Mugenyi P, Cao H. HIV-specific IL-10-positive CD8+ T cells are increased in advanced disease and are associated with decreased HIV-specific cytotoxicity. *J Immunol* 2006,176:1274-1280.
73. Angel JB, Saget BM, Wang MZ, Wang A, Dinarello CA, Skolnik PR. Interleukin-10 enhances human immunodeficiency virus type 1 expression in a chronically infected promonocytic cell line (U1) by a tumor necrosis factor alpha-independent mechanism. *J Interferon Cytokine Res* 1995,15:575-584.
74. Rabbi MF, Finnegan A, Al-Harhi L, Song S, Roebuck KA. Interleukin-10 enhances tumor necrosis factor-alpha activation of HIV-1 transcription in latently infected T cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998,19:321-331.
75. Finnegan A, Roebuck KA, Nakai BE, Gu DS, Rabbi MF, Song S, Landay AL. IL-10 cooperates with TNF-alpha to activate HIV-1 from latently and acutely infected cells of monocyte/macrophage lineage. *J Immunol* 1996,156:841-851.

76. Akridge RE, Oyafuso LK, Reed SG. IL-10 is induced during HIV-1 infection and is capable of decreasing viral replication in human macrophages. *J Immunol* 1994,153:5782-5789.
77. Saville MW, Taga K, Foli A, Broder S, Tosato G, Yarchoan R. Interleukin-10 suppresses human immunodeficiency virus-1 replication in vitro in cells of the monocyte/macrophage lineage. *Blood* 1994,83:3591-3599.
78. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999,42:1101-1108.
79. Chatterjee A, Rathore A, Sivarama P, Yamamoto N, Dhole TN. Genetic Association of IL-10 Gene Promoter Polymorphism and HIV-1 Infection in North Indians. *J Clin Immunol* 2009,29:71-77.
80. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996,381:667-673.
81. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996,272:1955-1958.
82. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, *et al.* The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996,85:1135-1148.
83. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996,381:661-666.
84. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, *et al.* A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996,85:1149-1158.
85. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996,272:872-877.

86. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996,382:829-833.
87. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, *et al.* The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996,382:833-835.
88. Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 1997,388:296-300.
89. Rucker J, Edinger AL, Sharron M, Samson M, Lee B, Berson JF, *et al.* Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 1997,71:8999-9007.
90. Furci L, Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognesi C, Quillent C, *et al.* Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med* 1997,186:455-460.
91. Xiao L, Rudolph DL, Owen SM, Spira TJ, Lal RB. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXC-chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. *Aids* 1998,12:F137-143.
92. Scala E, D'Offizi G, Rosso R, Turriziani O, Ferrara R, Mazzone AM, *et al.* C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J Immunol* 1997,158:4485-4492.
93. Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X, *et al.* Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,96:4581-4585.
94. An P, Nelson GW, Wang L, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, *et al.* Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002,99:10002-10007.
95. Zhao XY, Lee SS, Wong KH, Chan KC, Ma S, Yam WC, *et al.* Effects of single nucleotide polymorphisms in the RANTES promoter region in healthy and HIV-infected indigenous Chinese. *Eur J Immunogenet* 2004,31:179-183.

96. McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeberger CA, Al-Sharif FM, Ollier WE, Zimmerman PA, *et al.* Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *Aids* 2000,14:2671-2678.
97. Vidal F, Peraire J, Domingo P, Broch M, Cairo M, Pedrol E, *et al.* Polymorphism of RANTES chemokine gene promoter is not associated with long-term nonprogressive HIV-1 infection of more than 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,41:17-22.
98. Amara A, Gall SL, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, *et al.* HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 1997,186:139-146.
99. Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* 1998,279:389-393.
100. Vissoci Reiche EM, Ehara Watanabe MA, Bonametti AM, Kaminami Morimoto H, Akira Morimoto A, Wiechmann SL, *et al.* The effect of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) genetic polymorphism on HIV-1 disease progression. *Int J Mol Med* 2006,18:785-793.
101. Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Buchbinder SP, *et al.* Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med* 2001,135:782-795.
102. Easterbrook PJ, Rostron T, Ives N, Troop M, Gazzard BG, Rowland-Jones SL. Chemokine receptor polymorphisms and human immunodeficiency virus disease progression. *J Infect Dis* 1999,180:1096-1105.
103. Magierowska M, Theodorou I, Debre P, Sanson F, Autran B, Riviere Y, *et al.* Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 1999,93:936-941.
104. Soriano A, Martinez C, Garcia F, Plana M, Palou E, Lejeune M, *et al.* Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression

- of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J Infect Dis* 2002,186:922-931.
105. Vidal F, Peraire J, Domingo P, Broch M, Knobel H, Pedrol E, *et al.* Lack of association of SDF-1 3'A variant allele with long-term nonprogressive HIV-1 infection is extended beyond 16 years. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005,40:276-279.
106. Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, *et al.* Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* 1998,4:786-793.
107. van Rij RP, Broersen S, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *Aids* 1998,12:F85-90.
108. Brambilla A, Villa C, Rizzardì G, Veglia F, Ghezzi S, Lazzarin A, *et al.* Shorter survival of SDF1-3'A/3'A homozygotes linked to CD4+ T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000,182:311-315.
109. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996,273:1856-1862.
110. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 1998,352:866-870.
111. Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, *et al.* A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med* 1998,4:350-353.

112. Smith MW, Carrington M, Winkler C, Lomb D, Dean M, Huttley G, O'Brien SJ. CCR2 chemokine receptor and AIDS progression. *Nat Med* 1997,3:1052-1053.
113. Hendel H, Henon N, Lebuane H, Lachgar A, Poncelet H, Caillat-Zucman S, *et al.* Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998,19:381-386.
114. Mulherin SA, O'Brien TR, Ioannidis JP, Goedert JJ, Buchbinder SP, Coutinho RA, *et al.* Effects of CCR5-Delta32 and CCR2-64I alleles on HIV-1 disease progression: the protection varies with duration of infection. *Aids* 2003,17:377-387.
115. Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet* 1998,351:1632-1633.
116. Lee B, Doranz BJ, Rana S, Yi Y, Mellado M, Frade JM, *et al.* Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. *J Virol* 1998,72:7450-7458.
117. Mariani R, Wong S, Mulder LC, Wilkinson DA, Reinhart AL, LaRosa G, *et al.* CCR2-64I polymorphism is not associated with altered CCR5 expression or coreceptor function. *J Virol* 1999,73:2450-2459.
118. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Martinez AC. Chemokine control of HIV-1 infection. *Nature* 1999,400:723-724.
119. Singh KK, Barroga CF, Hughes MD, Chen J, Raskino C, McKinney RE, Spector SA. Genetic influence of CCR5, CCR2, and SDF1 variants on human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-related disease progression and neurological impairment, in children with symptomatic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2003,188:1461-1472.

120. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, Sheppard HW. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997,3:1160-1162.
121. Eugen-Olsen J, Iversen AK, Benfield TL, Koppelhus U, Garred P. Chemokine receptor CCR2b 64I polymorphism and its relation to CD4 T-cell counts and disease progression in a Danish cohort of HIV-infected individuals. Copenhagen AIDS cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998,18:110-116.
122. Schinkel J, Langendam MW, Coutinho RA, Krol A, Brouwer M, Schuitemaker H. No evidence for an effect of the CCR5 delta32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users. *J Infect Dis* 1999,179:825-831.
123. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, Gibbs R, Dearnaley DP, Dowe A, *et al.* Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002,62:3369-3372.
124. Aldener-Cannava A, Olerup O. HLA-DOB1 'low-resolution' typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP). *Eur J Immunogenet* 1994,21:447-455.
125. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001,29:E88-88.
126. Hariharan D, Douglas SD, Lee B, Lai JP, Campbell DE, Ho WZ. Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes. *Blood* 1999,93:1137-1144.
127. Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J Virol* 1998,72:7642-7647.
128. Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, *et al.* IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol* 1998,64:642-649.

129. Vasilescu A, Heath SC, Ivanova R, Hendel H, Do H, Mazoyer A, *et al.*
Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS cohort: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes Immun* 2003,4:441-449.
130. Stylianou E, Aukrust P, Kvale D, Muller F, Froland SS. IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression--down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 1999,116:115-120.
131. Elrefaei M, Ventura FL, Baker CA, Clark R, Bangsberg DR, Cao H. HIV-specific IL-10-positive CD8+ T cells suppress cytotoxicity and IL-2 production by CD8+ T cells. *J Immunol* 2007,178:3265-3271.
132. Barker E, Mackewicz CE, Levy JA. Effects of TH1 and TH2 cytokines on CD8+ cell response against human immunodeficiency virus: implications for long-term survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,92:11135-11139.
133. Vilades C, Broch M, Plana M, Domingo P, Alonso-Villaverde C, Pedrol E, *et al.* Effect of genetic variants of CCR2 and CCL2 on the natural history of HIV-1 infection: CCL2-2518GG is overrepresented in a cohort of Spanish HIV-1-infected subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007,44:132-138.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ก
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้ปลอดเชื้อระดับ 2	BioGARD®: USA
2. Biological Safety cabinet class II	Email Westinghouse: USA
3. CO ₂ Incubator	Nuaire: USA
4. กล้องจุลทรรศน์	Olympus, BSH: USA
5. เครื่องปั่น	Kubota 5200: Japan
6. เครื่องปั่นความเร็วสูง	Eppendorf 5415C: Germany
7. ถัง Liquid Nitrogen	Forma Scientific Inc.: USA
8. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	Sanya, 3F-C65: Thailand
9. ตู้แช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส	Revco, Ultima II: USA
10. ตู้เย็น	National, NR-A 153 SF: Thailand
11. Spectrophotometer	Eppendorf, 000576: Germany
12. เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ	Mile Diagnostics Swords CO.: Ireland
13. เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์	Becton Dickinson, FACScan or FACSort: USA
14. Mini/Medi Horizontal Gel Electrophoresis	Q-BIO gene, BIO 101@System: USA
15. เครื่องเพิ่มจำนวน DNA	Applied Biosystems, ABI 9700: USA
16. เครื่องเพิ่มจำนวน DNA	MJ Research PTC-200: USA
17. ไมโครเวฟ	Sharp: Thailand
18. Mixer	Vortex Genie, K-5500-GE: USA
19. Autopipette P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson: France
20. Heating block	Thermolyne: USA
21. Gel Doc-print	Viber Lourmat: France
22. UV transilluminator	FOTO/UV260: USA

ภาคผนวก ข

วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

- | | |
|-------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. หลอดทดลองที่มีน้ำยา ACD | Becton-Dickinson: USA |
| 2. หลอดทดลองที่มีน้ำยา K3-EDTA | Becton-Dickinson: USA |
| 3. หลอดทดลองขนาด 50 มล. | Corning: USA |
| 4. หลอดทดลองขนาด 15 มล. | Corning: USA |
| 5. 1.5 ml microfuge tube | Axygen®: USA |
| 6. 0.2 ml PCR tube | Axygen®: USA |
| 7. Transfer pipette | Sarsted: Germany |
| 8. 0.5-10 µl filter tip | Axygen®: USA |
| 9. 20 µl, 100 µl, 250 µl and 1000 µl filter tip | Rainin: USA |
| 10. 250 µl, 1000 tip | Axygen®: USA |
| 11. 1000 µl tip | Axygen®: USA |
| 12. 24 well tissue culture plate | Nunc™: USA |
| 13. 5 ml disposable seropipette | Costar®: USA |
| 14. 10 ml disposable seropipette | Costar®: USA |
| 15. ถุงมือ | Sempermed®: Thailand |
| 16. MicroAmp® optical tube | Applied Biosystems: USA |
| 17. 1.8 ml Cryovial | Costar®: USA |

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

ภาคผนวก ค
สารเคมีและน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

1. NaCl	Merck: Germany
2. Na ₂ HPO ₄	Merck: Germany
3. NaH ₂ PO ₄	Merck: Germany
4. Na ₂ EDTA·2H ₂ O	AnalaR: England
5. Tris-NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich®: USA
6. Trizma base	Amresco: USA
7. Boric acid anhydrous	Amresco: USA
8. Agarose	Bio-Rad: USA
9. 100 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP	BioLabs Inc.: UK
10. Absolute ethanol	Merck: Germany
11. Ethidium bromide	Sigma: USA
12. Tryphan blue	Merck: Germany
13. Lymphocyte separation medium	Cappel: USA
14. GIBCO™ RPMI Medium 1640	Invitrogen: USA
15. Fetal bovine serum	Invitrogen: USA
16. DMSO	Sigma: USA
17. Primers	Invitrogen: USA
18. LMW marker	BioLabs Inc.: UK
19. 100 bp marker	Fermentas: USA
20. Platinum Taq	Invitrogen: USA
21. Dnase/Rnase-free distilled water	Invitrogen: USA
22. QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen®: Germany
23. RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen®: Germany
24. QIAquick PCR Purification Kits	Qiagen®: Germany
25. MultiScribe™ Reverse Transcriptase	Applied Biosystems: USA

ภาคผนวก ง
การเตรียมน้ำยาที่ใช้ในการทดลอง

1. Tris-ammoniumchloride (Tris-NH₄Cl) pH 7.2
 - 1.1 0.17 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane

Tris(hydroxymethyl) aminomethane	20.6 กรัม
เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ	1,000 มล.
 - 1.2 0.16 M Ammonium chloride

Ammonium chloride	8.6 กรัม
เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ	1,000 มล.
 - 1.3 Working Tris-ammoniumchloride

เติม 10 มล. ของ 0.17 M tris(hydroxymethyl) aminomethane ลงใน 90 มล. ของ 0.16 M ammonium chloride และปรับ pH ให้เป็น 7.2. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยโดยใช้ความร้อน 121 องศาเซลเซียส, 15 ปอนด์/นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2. Phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0

10X PBS	
NaCl	80.0 กรัม
KCl	2.0 กรัม
Na ₂ HPO ₄	11.5 กรัม
KH ₂ PO ₄	2.0 กรัม
เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ	1,000 มล.
ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยโดยใช้ความร้อน 121 องศาเซลเซียส, 15 ปอนด์/นิ้ว เป็นเวลา 30 นาที	
IX PBS	
10X PBS	100 มล.
เติมน้ำปราศจากไอออน	800 มล.
ปรับ pH ให้เป็น 7.0, ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปราศจากไอออนให้ครบ 1000 มล.	

3. Tris-Borate/EDTA Electrophoresis buffer (TBE) pH 8.3

10X TBE

Tris(hydroxymethyl) aminomethane	121.1 กรัม
Boric acid anhydrous	55.6 กรัม
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3.7 กรัม
เติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1,000 มล.	

1X TBE

10X TBE	100 มล.
Add deionized water to	800 มล.
ปรับ pH ให้เป็น 8.3, ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1000 มล.	

4. 2% agarose

Agarose	2.0 กรัม
1X TBE	100 มล.

ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในไมโครเวฟ

5. 70% ethanol

Absolute ethanol	70 มล.
น้ำปราศจากไอออนและปลอดเชื้อ	30 มล.

6. 0.5 µg/ml Ethidium bromide (EtBr)

10 mg/ml EtBr	5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	100 มล.

7. 10 mM Tris⁺Cl (pH 7.0)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	0.121 กรัม
เติมน้ำปราศจาก DNA/RNA ให้ครบ	80 มล.

ปรับ pH ให้ได้ตามต้องการด้วย กรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้น ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำ
ปราศจาก DNA/RNA ให้ครบ 100 มล.