

| | |
|-----------------------|--|
| Thesis Title | Study of Cytokine Response by Intracellular Cytokine Detection and Confirmation of HIV Non-infection in HIV Highly Exposed Persistently Seronegative persons |
| Author | Miss Praijitr Tanan |
| Degree | Master of Science (Medical Technology) |
| Thesis Advisor | Asst. Prof. Sakchai Dettrairat |

ABSTRACT

Resistance to HIV infection in individuals who are repeatedly exposed to the human immunodeficiency virus (HIV), but remain uninfected (HEPS), are likely involed by their acquired immunity, inheritance of a dysfunctional CCR5 HIV-1 coreceptor, or viral inoculum. HIV-specific IgA is commonly present in HEPS persons and it neutralizes primary strains of HIV-1 in vitro. Additionally, the patterns of cytokine production have been postulated to shift from Th1 to Th2-type cytokines with the progression of HIV-associated disease. Although there have been studies of cytokines in HEPS and HIV-infected prostitutes, no data are available on serum IgA and cytokine production in spouses of HEPS persons and their HIV-infected sex partners.

To confirm the infection of HIV and understand the role of antibody and cytokine response, HEPS persons were compared with their HIV-1 seropositive sex partners and normal controls. During 2001 to 2002, nineteen HEPS persons and their HIV type 1-seropositive sex partners (n=17) from Sanpatong Hospital, Chiang Mai, were studied for HIV-specific antibody response in classes (IgG, IgA and IgM) by Flow Cytometric Immunofluorescence Assay (FIFA) and cytokine response with 12 months trimonthly follow-up. Fifteen low risk HIV-1-seronegative persons acted as controls. Neither HEPS nor normal controls were reactive with HIV antibody (0%), while all HIV-infected sex partners (n=17) were positive (100%). None of the subject groups was detected with p24 antigen (0%). To confirm HIV-1 non-infection, multiplex nested-PCR was performed in HEPS persons and their sex partners. The results were concordance with the HIV antibody and all HEPS persons had undetected pro-viral DNA of HIV, while all HIV-infected sex partners were found proviral DNA. All 19 HEPS individuals (100%) and 15 healthy adults (100%) were negative for IgG, IgA and IgM classes of HIV-1/2 antibody. HIV-specific IgG responses were detected in sera of 17 HIV-infected sex partners (100%), while detection of HIV-specific IgA

and IgM was randomized in individuals and each visit. The production of type 1 (Th1: interleukin-2 or IL-2, interferon- γ or IFN- γ) and type 2 (interleukin-4 or IL-4) cytokines by mitogen-stimulated whole blood was measured by intracellular cytokine staining on a single cell level of CD4 and CD8 T cells. In this experiment, IL-2, IFN- γ and IL-4 producing CD4 T cells were detected in approximately 24.00-49.06%, 5.05-14.21% and 0.54-2.57% of healthy controls, respectively. The significant percentage decrease of IL-2 (Th1 cytokine) among CD4 T cells, seen in individual HIV-infected sex partners, was lower than that in samples from HEPS individuals ($p < 0.001$). Furthermore, no significant difference was found between percentages of IL-2-producing CD4 T cells in HEPS individuals and healthy controls groups ($p > 0.05$). There was impaired ability of CD4+ T cells to synthesize IFN- γ in HIV infected individuals compared with healthy controls ($p < 0.005$), but there was no significant difference between HEPS and healthy controls groups ($p > 0.05$). Nevertheless, a significantly increased proportion of CD8 T cells with the ability to expressed large amounts of IFN- γ in HIV-infected sex partners was found, compared with HEPS persons and healthy controls ($p < 0.001$). The percentage of IL-4-producing cells of activated T cells in the normal control group was low ($< 5\%$) and no differences were observed between HIV-infected sex partners and HEPS individuals ($p > 0.05$). These data suggested (1) that in HIV-infected persons, results of decreased percentages of IL-2, IFN- γ (Th1 cytokine) producing CD4+ T cells, but normal percentages of IL-4 (Th2 cytokine) (2) that a strong increased percentages of IFN- γ (Th1 cytokine) producing CD8+ T cells in HIV-infected persons (3) and no significant differences in percentages of IL-2, IFN- γ (Th1 cytokine) and IL-4 (Th2 cytokine) producing CD4+ T cells between HEPS persons and normal control group were observed.

Based on the data of this study, concluded that resistance to HIV infection in HEPS persons is not clear, but results of measuring intracellular cytokines partially support the “Th1→Th2 Switch” hypothesis in HIV infection and the role of cytokine imbalances in AIDS pathogenesis. These results have important implications for the therapeutical strategies against HIV infection. Further investigations are needed to explore this hypothesis and other factors for resistance to HIV infection in HEPS individuals.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การศึกษาการตอบสนองของไซโตไคน์โดยการตรวจวัดไซโตไคน์ภายในเซลล์ และการตรวจยืนยันการไม่ติดเชื้อเอชไอวี ในผู้ที่สัมผัสเชื้อเอชไอวีบ่อยแต่ไม่สร้างแอนติบอดี

ผู้เขียน

นางสาวไพโรจิตร ดานัน

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ศักดิ์ชัย เดชตรัยรัตน์

บทคัดย่อ

ผู้ที่สัมผัสเชื้อเอชไอวีบ่อยและเป็นเวลานานแต่ไม่พบการติดเชื้อเอชไอวี (HIV highly exposed persistently seronegative; HEPS) พบว่าการต้านทานการติดเชื้อในคนกลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันที่ได้รับภายหลัง CCR5 ซึ่งเป็นตัวรับร่วมของเชื้อเอชไอวีบนผิวเซลล์ไม่ทำงาน หรือการที่จำนวนไวรัสที่ได้รับมีปริมาณต่ำหรือเป็นไวรัสที่เสียสภาพ ไม่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ นอกจากนี้ ในกลุ่ม HEPS ยังพบว่ามี HIV-specific IgA ซึ่งสามารถลบล้างฤทธิ์ของเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์เริ่มต้นได้ในหลอดทดลอง ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่ารูปแบบการสร้างและชนิดของไซโตไคน์จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการพัฒนาการไปสู่การเป็นโรคเอดส์ โดยมีการสร้างไซโตไคน์ชนิด Th2 เพิ่มขึ้นในขณะที่การสร้างไซโตไคน์ชนิด Th1 ลดลง อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีศึกษาระดับไซโตไคน์ใน HEPS ที่เป็นกลุ่มหญิงขาบริการกับผู้ติดเชื้อเอชไอวี แต่ยังไม่มีความรู้ข้อมูลการรายงานเกี่ยวกับ IgA ในซีรัม และการสร้างไซโตไคน์ในกลุ่ม HEPS ที่เป็นคู่สามีภรรยา

เพื่อยืนยันการติดเชื้อเอชไอวี และทำความเข้าใจในบทบาทของการตอบสนองของแอนติบอดีและการตอบสนองของไซโตไคน์ในกลุ่ม HEPS เมื่อเปรียบเทียบกับคู่สามีหรือภรรยาที่ติดเชื้อเอชไอวี และกลุ่มควบคุมที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี จึงได้ทำการศึกษาในกลุ่ม HEPS จำนวน 19 คนพร้อมคู่สามีหรือภรรยาที่ติดเชื้อเอชไอวี จากโรงพยาบาลสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2545 โดยได้ศึกษาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีแต่ละชนิด คือชนิด IgG IgA และ IgM โดยวิธี Flow Cytometric Immunofluorescence Assay (FIFA) รวมถึงการสร้างไซโตไคน์ชนิดต่างๆ โดยติดตามทุก 3 เดือน เป็นระยะเวลา 12 เดือน ในการศึกษานี้ได้ใช้กลุ่มคนปกติซึ่งไม่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 15 คน เป็นกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่ม HEPS (n=19) และในกลุ่มควบคุม (n=15) ไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ในขณะที่คู่สามีหรือภรรยาที่ติดเชื้อ (n=17) จะตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีทั้งหมด โดยไม่พบเอชไอวีแอนติเจนในทุกกลุ่มที่ศึกษา เพื่อยืนยันการไม่ติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่ม HEPS และในคู่สามีหรือภรรยาที่ติดเชื้อเอชไอวี จึงทำการทดสอบด้วย multiplex nested-PCR เพื่อตรวจหา pro-viral DNA พบว่าผลสอดคล้องกับการตรวจแอนติบอดีต่อเอชไอวี นั่นคือไม่พบ pro-viral DNA ในกลุ่ม HEPS ในขณะที่คู่สามีหรือภรรยาที่ติดเชื้อจะตรวจพบ pro-viral DNA ทุกราย ในกลุ่ม HEPS (19 ราย) และกลุ่มควบคุม (15 ราย) ไม่พบการตอบสนองของแอนติบอดีชนิด IgG IgA และ IgM ต่อ HIV-1 และ HIV-2 แต่ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี (17 ราย) จะพบการตอบสนองของเอชไอวีแอนติบอดี โดยตรวจพบ HIV-specific IgG ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด (17 ราย) ในขณะที่ HIV-specific IgA และ IgM จะพบแบบสุ่มในแต่ละบุคคล และในแต่ละระยะการศึกษาติดตาม การศึกษานี้ได้ทำการตรวจวัดการตอบสนองของไซโตไคน์ชนิด type1 หรือ Th1 cytokine ใน CD4 T cells และ CD8 T cells ซึ่งประกอบด้วย interleukin-2 (IL-2) และ interferon-gamma (IFN- γ) และไซโตไคน์ชนิด type 2 หรือ Th2 cytokine คือ interleukin-4 (IL-4) โดยการข้อม intracellular cytokine โดยกระตุ้นเม็ดเลือดขาว (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) ในตัวอย่างเลือดโดยตรง ด้วย mitogen แล้ววัดการตอบสนองของไซโตไคน์ที่สร้างภายในเซลล์แต่ละชนิด จากการทดลองพบว่า CD4 T cells ในกลุ่มคนปกติหรือกลุ่มควบคุม จะสร้าง IL-2, IFN- γ และ IL-4 มีค่าอยู่ระหว่าง 24.00-49.06%, 5.05-14.21% และ 0.54-2.57% ตามลำดับ การตอบสนองของ IL-2 ในเซลล์ CD4 T cells ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี จะต่ำกว่ากลุ่ม HEPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม HEPS กับกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$) ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่า การตอบสนองของไซโตไคน์ชนิด IFN- γ ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะมีระดับต่ำอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.005$) แต่กลุ่ม HEPS และกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่า ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี ค่าร้อยละเซลล์ CD8 T cells ที่สร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ เพิ่มขึ้นมาก ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม HEPS และกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$) ระดับการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-4 ในเซลล์ CD4 T cells ที่วัดได้จะมีค่าต่ำในกลุ่มควบคุมคือน้อยกว่าร้อยละ 5 และไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี ($p > 0.05$) และกลุ่ม HEPS ($p > 0.05$) จากข้อมูลนี้แสดงว่า

- 1) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ค่าร้อยละของเซลล์ CD4+ T cells ที่สร้าง IL-2 และ IFN- γ ซึ่งเป็น Th1 cytokine ลดลง แต่ค่าร้อยละของเซลล์ที่สร้าง IL-4 ซึ่งเป็น Th2 cytokine ไม่เปลี่ยนแปลง
- 2) ค่าร้อยละของ CD8+ T cells ที่สร้าง IFN- γ ซึ่งเป็น Th1 cytokine เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในผู้ติดเชื้อเอชไอวี และ
- 3) ค่าร้อยละของเซลล์ CD4+ T cells ที่สร้าง IL-2, IFN- γ ซึ่งเป็น Th1 cytokine และ IL-4 ซึ่งเป็น Th2 cytokine ในกลุ่ม HEPS และกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลจากการศึกษา สรุปได้ว่าปัจจัยที่มีผลให้เกิดการต้านทานการติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่ม HEPS ยังไม่ชัดเจน แต่ผลที่ได้จากการตอบสนองของไซโตไคน์ในระดับเซลล์ ได้สนับสนุนบางส่วนของทฤษฎี “Th1 \rightarrow Th2 Switch” และสนับสนุนข้อมูลที่จะเกิดความไม่สมดุลของการสร้างไซโตไคน์ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งมีพัฒนาการไปสู่การเป็นโรคเอดส์ ผลจากการศึกษานี้จะช่วยเป็นแนวทางในการให้การรักษาสื่อเชื้อเอชไอวีต่อไป อย่างไรก็ตาม ยังมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อหาคำตอบสำหรับทฤษฎีนี้ รวมถึงต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นๆที่มีบทบาทในการต้านทานการติดเชื้อเอชไอวีในกลุ่ม HEPS ต่อไป