

**การกระจายตัวของฮีวแมนนิวโทรฟิลแอนติเจนในประชากรไทย**

**Distribution of Human Neutrophil Antigen (HNA) in Thais**

**ชลันดา กองมะเร็ง**

**เกษร คำแก่น**

**การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ**

**ปีการศึกษา 2552**

ชื่อเรื่อง	การกระจายตัวของฮีวแมนนิวโทรฟิลแอนติเจนในประชากรไทย	
ผู้วิจัย	ชลันดา กองมะเร็ง และ เกษร คำแก่น	
สถาบัน	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	
ปีที่พิมพ์	2557	
สถานที่พิมพ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	
จำนวนหน้ารายงานวิจัย	55	หน้า
คำสำคัญ	แอนติเจนของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล, ปฏิกริยาภูมิต้านทาน, ประชากรไทย	
ลิขสิทธิ์	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ	

### บทคัดย่อ

แอนติบอดีต่อแอนติเจนนิวโทรฟิล(Human Neutrophil Antigens; HNAs) มีบทบาทสำคัญในการเกิดภาวะ immune-mediated neutropenia และ antibody-mediated transfusion related acute lung injury (TRALI) การตรวจหาแอนติเจน HNA มีความสำคัญต่อการคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วย ปัจจุบันแอนติเจน HNA แบ่งออกเป็น 5 ระบบ การกระจายตัวของแอนติเจนแต่ละระบบในประชากรแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกัน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ด้วยวิธี PCR-SSP ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้ซึ่งเป็นผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลระยองที่มีเชื้อชาติไทยอย่างน้อย 2 รุ่น จำนวน 230 ราย ผลการทดลองพบความถี่ของแอนติเจน HNA-1a (0.722) มากกว่าสองเท่าของ HNA-1b (0.274) ความถี่ของ HNA-1c เท่ากับ 0.009 และพบความถี่ของ HNA-1 null (0.004) ในกลุ่มตัวอย่างนี้ด้วย ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างความถี่ของแอนติเจนที่พบในประชากรเชื้อชาติไทยแท้กับเชื้อชาติไทยที่อาศัยอยู่ในภาคกลาง และเชื้อชาติอื่นๆ พบการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรชาวไทยแท้ที่อาศัยอยู่ทางภาคตะวันออกของไทยมีความคล้ายคลึงกับชาวจีนเชื้อสายฮั่น ชาวไต้หวัน ชาวญี่ปุ่น และชาวเกาหลี แต่กลับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value < 0.05) กับข้อมูลของประชากรเชื้อชาติไทยที่อาศัยอยู่ในภาคกลาง ชาวอินเดีย และชาวคอเคเซียน (ตุรกี ออสเตรเลียน คุนิเซียน อเมริกัน เยอรมัน และอิตาลี) การศึกษานี้จึงช่วยชี้ให้เห็นแนวโน้มของการเกิดภาวะ neutropenia และ TRALI ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้ที่น่าจะมีสาเหตุจาก anti-HNA-1a เช่นเดียวกับในชาวจีนเชื้อสายฮั่นและประชากรชาวเอเชีย รวมทั้งการนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลของการคัดเลือกผู้บริจาคและการศึกษาทางมานุษยวิทยาต่อไป

**Research Title** Distribution of Human Neutrophil Antigen (HNA) in Thais  
**Researchers** Chalunda Kongmaroeng and Kesorn Kumkaen  
**Institution** Hauchiew Chalermprakiet University  
**Year of Publication** 2014  
**Publisher** Huachiew Chalermprakiet University  
**Sources** Hauchiew Chalermprakiet University  
**No. of Pages** 55 pages  
**Keywords** Human neutrophil antigen, Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer; PCR-SSP, Thais  
**Copyright** Hauchiew Chalermprakiet University

### **ABSTRACT**

Alloimmunization against human neutrophil antigens (HNAs) has been reported to cause immune neutropenia, refractoriness to granulocyte transfusion and transfusion-related acute lung injury (TRALI). Currently five HNA systems (HNA-1 to HNA-5) have been described. The frequencies of HNAs have been reported in different ethnic populations. The different antigens are a result of nucleotide substitution on the genomic DNA level. The frequencies of HNAs have been reported in different ethnic populations. The aim of this study is to determine the frequency of HNA-1a, -1b and -1c in Thai blood donors by polymerase chain reaction - sequence-specific primers (PCR-SSP) method. Two hundred and thirty unrelated healthy Thai blood donors from Rayong province, was called eastern Thais, were selected and all were interviewed about their ancestry. The results shown the frequencies of HNA-1a, -1b and -1c were 0.722, 0.274 and 0.009, respectively. In addition, HNA-1null (0.004) was also found in this study. The HNA-1a and -1b frequencies found in Thais are similar to those of previous reports involving Han Chinese, Japanese, Taiwanese, and Korean populations. In contrast, the Eastern Thais results show statistically significant difference ( $p$ -value < 0.05) to those involving Central Thais, Indian, Turkish, Australian, Tunisian, American, German, and Italian populations. This information is important not only for the assessment of neutrophil antibody-mediated clinical conditions and for disease association studies, but also for anthropological studies.

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก  
โรงพยาบาลระยอง จ.ระยอง ทุกคนที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ  
ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีเพื่อใช้ในการงานวิจัย

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้  
ลุล่วงไปได้ด้วยดี

และที่สำคัญที่สุด ขอขอบคุณผู้บริจาคเลือดทุกท่านที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดสำหรับใช้ใน  
การวิจัยนี้

ชลันดา กองมะเร็ง

เกษร คำแก่น

## สารบัญ

	หน้า	
บทคัดย่อภาษาไทย	ก	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข	
กิตติกรรมประกาศ	ค	
สารบัญ	ง	
สารบัญตาราง	จ	
สารบัญรูปภาพ	ฉ	
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ช	
<b>บทที่ 1</b>	<b>บทนำ</b>	
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
	1.4 ข้อยกเว้นของการวิจัย	3
	1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
	1.6 ประโยชน์ที่ได้รับ	3
<b>บทที่ 2</b>	<b>เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	4
<b>บทที่ 3</b>	<b>ระเบียบวิธีวิจัย</b>	
	3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้	23
	3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้	23
	3.3 วิธีการทดลอง	24
	3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ	27
<b>บทที่ 4</b>	<b>ผลการวิจัย</b>	28
<b>บทที่ 5</b>	<b>อภิปรายผล</b>	31
<b>บทที่ 6</b>	<b>สรุปผลและข้อเสนอแนะ</b>	37
<b>บรรณานุกรม</b>		41
<b>ภาคผนวก</b>	ก. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	49
	ข. การเตรียมสารเคมี	51
	ค. ประวัติย่อผู้วิจัย	55

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การเรียกชื่อแอนติเจน HNA ตามระบบของ ISBT working party	7
2.2	ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>FCGR3A</i> และ <i>FCGR3B</i>	9
2.3	ความถี่ของแอนติเจน HNA ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ	21
3.1	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา HNA-1 โดยวิธี PCR-SSP	26
4.1	การทดสอบ Hardy–Weinberg Equilibrium ของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ จำนวน 230 ราย	30
4.2	ความถี่อัลลีลของ HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้	30
5.1	เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ระหว่างวิธีของ Han TH และคณะ (Han TH. <i>et al.</i> , 2006) และวิธีที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่	32
5.2	ความถี่ของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้กับ ประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ	36

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ความแตกต่างของกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อ HNA-1 บน Fc $\gamma$ RIIIb	9
2.2	หลักการการตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing based typing (SBT)	18
2.3	หลักการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะโดยวิธี PCR-SSP	18
3.1	การแปลผลการตรวจหา HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่รู้ชนิดจีโนไทป์ของ HNA-1	27
4.1	ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ของตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมด้วยวิธี PCR-SSP	28
4.2	ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้โดยวิธี PCR-SSP	29
4.3	ผลการตรวจหา HNA-1c ในดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้	30
5.1	Neighbor-joining tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ของประชากรเชื้อชาติไทยกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ	33

## อักษรย่อและสัญลักษณ์

ANC	absolute neutrophil count
ANN	alloimmune neonatal neutropenia
$\alpha$ chain	alpha chain
AIN	autoimmune neutropenia
bp	base pair
$\beta$ 2-integrin	beta 2-integrin
CR3 $\psi$	C3bi receptor
$\lambda^2$	chi-square
CML	chronic myelogenous leukemia
Fc	complement fragment
Fc $\gamma$ R	complement fragment gamma receptor
$^{\circ}$ C	degree celsius
dNTPs	deoxynucleoside triphosphates
DNA	deoxyribonucleic acid
FFP	fresh frozen plasma
gp	glycoprotein
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GAT	granulocyte agglutination test
GCLT	granulocyte chemiluminescence test
GIFT	granulocyte immunofluorescence test
HWE	Hardy-Weinberg equilibrium
HDFN	hemolytic disease of the fetus and newborn
HGH	human growth hormone
HNA	human neutrophil antigen
Ig	immunoglobulin
IC	internal control
ISBT	International Society of Blood Transfusion
kDa	kilodalton

## อักษรย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

LFA-1	leukocyte function antigen-1
MgCl <sub>2</sub>	magnesium chloride
μl	microliter
mM	millimole
MPHA	mixed passive hemagglutination assay
MAIGA	monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigen
ng	nano gram
NMLB	nuclear membrane lysis buffer
ω-site	omega-site
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
PaGIA	particle gel agglutination assay
%AF	percentage of allele frequency
%GF	percentage of genotype frequency
PCR-SSOP	polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotide probes
PCR-SSP	polymerase chain reaction with sequence specific primer
PCR-RFLP	polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism
PCR-SBT	polymerase chain reaction-sequence based typing
RCLB	red cell lysis buffer
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
RA	rheumatoid arthritis
rpm	round per minus
SNP	single nucleotide polymorphism
SLE	systemic lupus erythrematosus
TRALI	transfusion related acute lung injury
uPAR	urokinase type plasminogen activator receptor
WGS	whole genome sequencing
มล.	มิลลิลิตร
ลบ. มม.	ลูกบาศก์มิลลิเมตร



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฮิวแมนนิวโทรฟิลแอนติเจน (human neutrophil antigen: HNA) เป็นแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล และสามารถพบได้เล็กน้อยบนผิวเซลล์แกรนูโลไลไซต์ (granulocyte) อื่น ๆ ได้แก่ เบโซฟิล (basophil) และอีโอซิโนฟิล (eosinophil) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA เกิดจากการมีภาวะต่อเนื้องจากกลุ่มอาการ rheumatoid arthritis (RA) และ systemic lupus erythematosus (SLE) หรือการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial infection) ในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะ autoimmune neutropenia ได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ นอกจากนี้ ยังอาจเกิดจากการถูกกระตุ้นภายหลังการรับเลือด (post transfusion) หรือปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจน HNA ไม่ตรงกัน (HNA incompatible) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเกิดการตอบสนองและสร้างแอนติบอดีในกลุ่ม alloimmune antibody ขึ้นมาก่อนทำให้เกิดภาวะ neutropenia, febrile transfusion reaction, granulocyte refractoriness และ transfusion related acute lung injury (TRALI) เป็นต้น (Ravetch JV and Perussia B. 1989; Moritz E *et al.* 2009) จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าผู้ป่วยที่มีภาวะเหล่านี้มักเกิดอาการรุนแรงและถึงขั้นเสียชีวิต (Davoren A *et al.* 2004) การคัดเลือกผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลตรงกับแอนติบอดีที่ผู้ป่วยมีจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่สุดเพื่อป้องกันการเกิดภาวะดังกล่าว

ปัจจุบัน แอนติเจน HNA แบ่งออกเป็น 5 ระบบ ได้แก่ HNA-1, HNA-2, HNA-3, HNA-4 และ HNA-5 (Fung YL *et al.* 2003; Bux J. 2008; Moritz E *et al.* 2009) แต่ละระบบแบ่งออกเป็น หมู่ย่อย ๆ ตามความแตกต่างของลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงอย่างจำเพาะในระบบนั้น เช่น ระบบที่ 1 แบ่งออกเป็น 3 หมู่ย่อย ได้แก่ HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c ระบบที่ 3 แบ่งออกเป็น 2 หมู่ย่อย ได้แก่ HNA-3a และ HNA-3b เป็นต้น (Bux J. 2008) รายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ความถี่ของแอนติเจน HNA แต่ละระบบในแต่ละเชื้อชาติมีความแตกต่างกัน และแอนติเจนแต่ละระบบจะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เกิดภาวะต่าง ๆ ได้แตกต่างกันด้วย (Kissel K *et al.* 2000; Abid S *et al.* 2001; Yan L *et al.* 2005; Cardone JD *et al.* 2006; Bux J. 2008; Moritz E *et al.* 2009; Norcia AM *et al.* 2009) ตัวอย่างเช่น การกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรชาวเอเชีย (asians) และคอเคเซียน (caucasian) พบว่าในประชากรชาวเอเชียจะพบความถี่ของแอนติเจน HNA-1a สูงกว่า HNA-1b ตรงข้ามกับชาวคอเคเซียนที่พบ HNA-1b ได้สูงกว่า ส่งผลให้การตรวจพบชนิดของแอนติบอดีที่ก่อให้เกิดภาวะ neutropenia ในประชากรทั้งสองเชื้อชาติแตกต่างกัน การศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA จึงไม่เพียงแต่จะมีประโยชน์ต่อ

การคัดเลือกผู้บริจาคเลือดให้แก่ผู้ป่วย และจัดทำฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการคัดเลือกผู้บริจาค แต่ยังสามารถใช้ในการทำนายโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ alloimmunization ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ได้อีกด้วย (Chu CC *et al.* 2001)

ในระยะแรก การตรวจหาแอนติเจน HNA นิยมใช้วิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serological assay) เช่น วิธี granulocyte immunofluorescence test (GIFT), particle gel agglutination assay (PaGIA) และ monoclonal antibody immobilization of granulocyte antigen (MAIGA) (Han KS and Um TH. 1997; Abou-Chaker K *et al.* 2009; Norcia AM *et al.* 2009) เนื่องจากการตรวจทางด้านนี้ทำได้ยากเพราะมีข้อจำกัดจากการขาดแคลนแอนติซีรัมที่จำเพาะกับแอนติเจน และวิธีการทดสอบมีความจำเพาะต่ำ มักเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) อีกทั้งจำเป็นต้องใช้เซลล์ที่เจาะเก็บใหม่ ๆ ปัจจุบัน จึงมีการนำความรู้ทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยในการพัฒนาเทคนิคการตรวจหาแอนติเจน HNA ในระดับโมเลกุล (molecular assay) เช่น เทคนิค polymerase chain reaction with sequence specific primer (PCR-SSP), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP) และ polymerase chain reaction-sequence based typing (PCR-SBT) เป็นต้น (Bux J *et al.* 1995; Abid S *et al.* 2001; Cardone JD *et al.* 2006; Tsuno H *et al.* 2011) การเลือกใช้เทคนิคต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับความสามารถและความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์จะตรวจหาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ซึ่งมีความหลากหลายและมีการกระจายตัวแตกต่างกันในประชากรแต่ละเชื้อชาติด้วยวิธี PCR-SSP เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาในการตรวจน้อย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ และมีราคาแพง รวมทั้งไม่ต้องใช้แอนติบอดีที่จำเพาะและหาได้ยากด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) พัฒนาชุดน้ำยาตรวจหาแอนติเจน HNA-1 ขึ้นมาใช้ในห้องปฏิบัติการ
- 2) ศึกษาความถี่ของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรไทยที่มีเชื้อชาติไทยแท้

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาชุดน้ำยาตรวจหาแอนติเจน HNA-1 ด้วยวิธี PCR-SSP โดยใช้ดีเอ็นเอที่รู้ชนิดของยีนเป็นตัวควบคุมการทดลอง แล้วนำมาตรวจหา HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดที่มีเชื้อชาติไทยแท้ของโรงพยาบาลระยอง เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการกระจายตัวของ HNA-1 ในประชากรไทยที่มีเชื้อชาติไทยแท้ต่อไป

#### 1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย

งานวิจัยนี้ไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงที่มียีนที่จำเพาะต่อ HNA-1c เนื่องจากแอนติเจนนี้ตรวจพบได้น้อยในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธีการดูขนาดของแถบ (band) ที่ปรากฏจากการออกแบบ primer ที่จำเพาะกับอัลลีล เปรียบเทียบกับตำแหน่งของ molecular weight marker ร่วมกับการนำส่งห้องปฏิบัติการเฉพาะทางเพื่อตรวจยืนยันผลโดยวิธีการหาลำดับเบส

#### 1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

**Human neutrophil antigen (HNA)** หมายถึง แอนติเจนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการอักเสบแบบเฉียบพลันในระยะแรก และมีความสำคัญต่อการให้เลือดแก่ผู้ป่วยที่มีภาวะ neutropenia

**Neutropenia** หมายถึง ภาวะขาดแคลนเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะนี้จะมี absolute neutrophil count (ANC) น้อยกว่า 1,500 ตัว/ลบ. มม. และมีแนวโน้มที่จะลดต่ำลงจนถึง < 500 ตัว/ลบ. มม.

**Polymerase chain reaction (PCR)** หมายถึง เทคโนโลยีของการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอ เป้าหมายโดยอาศัยไพรเมอร์ (primer) ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเกาะตั้งต้นเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ เพื่อให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสสามารถสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ได้

**Sequence specific primer (SSP)** หมายถึง ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสที่ปลาย 3' จำเพาะกับลำดับเบสของยีนที่ต้องการตรวจหา หรืออีกนัยหนึ่ง เป็นชื่อของเทคนิคการตรวจหายีนโดยการใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับของเบสที่ปลาย 3' เป็นคู่สมกับลำดับเบสของยีนที่ต้องการตรวจหา

#### 1.6 ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1) ได้ชุดน้ำยาสำหรับตรวจหาแอนติเจน HNA-1 สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อการเรียนการสอนและงานวิจัยต่อไป
- 2) ได้ข้อมูลชนิดของแอนติเจน HNA-1 ของผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลระยอง สำหรับใช้ในการจัดทำฐานข้อมูลผู้บริจาคเลือด เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วย และใช้ในการคัดเลือกเซลล์สำหรับใช้ในการตรวจคัดกรองหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไป
- 3) ทราบข้อมูลการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรไทยที่มีเชื้อชาติไทยแท้

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นิวโทรฟิล (neutrophil) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation response) โดยจะทำหน้าที่เป็น phagocytosis เพื่อกลืนกินแอนติเจนแปลกปลอม (foreign antigen) ก่อนเกิดกระบวนการ apoptosis โดยเซลล์ neutrophil จะทำหน้าที่เป็น phagocyte ชนิดแรกที้ออกจากกระแสเลือดไปสู่เนื้อเยื่อที่มีสิ่งแปลกปลอม เนื่องจากบนผิวของ neutrophil มี receptor สำหรับส่วน complement fragment (Fc) ของ immunoglobulin (Ig) หรือที่เรียกว่า complement fragment gamma receptor (Fc $\gamma$ R) ทำให้สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เคลือบด้วย antibody ชนิด IgG ได้ แอนติเจนของเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “ฮิวแมนนิวโทรฟิลแอนติเจน” (human neutrophil antigen: HNA) จะสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ และเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ neutropenia หรือ granulocytopenia จากรายงานการศึกษาการเกิดภาวะ alloimmunization ในสตรีตั้งครรภ์พบว่า แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-1a (NA1) และ HNA-1b (NA2) ที่มารดาสร้างขึ้นสามารถกระตุ้นให้ทารกแรกคลอดหรือทารกที่อยู่ในครรภ์เสียชีวิตเนื่องจากภาวะ alloimmune neonatal neutropenia (ANN) (Kissel K *et al.* 2000) และพบว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้ยังเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ transfusion related acute lung injury (TRALI) และ chronic benign autoimmune neutropenia (AIN) ในเด็กได้อีกด้วย (Moritz E *et al.* 2009) จากการศึกษาที่ผ่านมา ทำให้ทราบว่า ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงความเป็นแอนติเจนของ neutrophil ตั้งอยู่บนแขนข้างยาวของ chromosome คู่ที่ 1 (1q23) บนที่รับที่มีความจำเพาะ (specific receptor) สำหรับ Fc ของ IgG ซึ่งมีอยู่ 3 classes ได้แก่ Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII และ Fc $\gamma$ RIII และพบว่า Fc $\gamma$ RIII ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกด้วย (Ravetch JV and Perussia B. 1989; Hessner MJ *et al.* 1996; Bux J and Chapman J. 1997; Matsuo K *et al.* 2000) งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาประวัติการค้นพบแอนติเจน neutrophil การเรียกชื่อแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ของ neutrophil ความสำคัญและวิธีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนแต่ละชนิด เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการทำวิจัย

#### 2.1 ประวัติการค้นพบและการตั้งชื่อ Human Neutrophil Antigen

ในปี ค.ศ. 1971 Lalezari P และคณะ ได้รายงานการตรวจพบ neutrophil-specific antigen (NA1) โดยใช้วิธีการตรวจทาง serology เป็นครั้งแรกในซีรัมของผู้ป่วยที่ตั้งครรภ์และมีภาวะ

alloimmunization จนเป็นสาเหตุให้ทารกที่คลอดมาเกิดภาวะ neonatal neutropenia (Lalezari P *et al.* 1971) ในขณะนั้นยังไม่สามารถอธิบายคุณลักษณะที่จำเพาะของ NA1 ได้ว่ามีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในลักษณะใด

ต่อมาในปี ค.ศ. 1965 Lalezari P และ Bernard GE ได้รายงานการตรวจพบแอนติเจน HNA เพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งชนิด คือ NA2 (Lalezari P and Bernard GE. 1965) และจากผลการตรวจหาความหลากหลายของยีน NA1 และ NA2 โดยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ sequencing based typing (SBT) พบว่ายีนของแอนติเจน NA2 นี้อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กับอัลลีล (allele) ของ NA1 และมีลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันเพียง 5 base pair (bp) เท่านั้น (Matsuo K *et al.* 2000)

ในปี ค.ศ. 1971 Lalezari P และคณะ ได้รายงานการตรวจพบแอนติเจน NB1 หรือ HNA-2a จากการศึกษาในทารกแรกคลอด 7 ราย ซึ่งกำเนิดมาจาก 4 ครอบครัว โดยพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน NB1 จะไม่ทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (non agglutination) กับเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ ยกเว้นเซลล์ neutrophil (Lalezari P *et al.* 1971) เช่นเดียวกับในเรื่องของการถูกดูดซับ (absorption) ของแอนติเจน NB2 ที่จะไม่ถูกดูดซับโดยเซลล์ที่เตรียมมาจาก solid organ และเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ ยกเว้น neutrophil และจากการศึกษาทาง molecular ยังพบว่ายีน NB อยู่คนละโลคัส (locus) กับยีน NA และมีการกระจายตัวของยีน NB1 แบบโฮโมไซกัส (homozygous) ประมาณ 68% ของประชากรชาวนิวยอร์ค (New York) และแบบเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ประมาณ 29% ในขณะที่อีกประมาณ 3% ของประชากรนั้นให้ผลเป็นลบ (negative) ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังสรุปว่า ยีน NB นี้เป็นยีนที่ตั้งอยู่คนละตำแหน่งกับยีน HLA และยีนอื่น ๆ ที่แสดงออกถึงแอนติเจนของเม็ดเลือดขาว (leukocyte) และยังไม่มียารายงานอุบัติการณ์ของความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจน NA, NB และแอนติเจนของเม็ดเลือดแดง

ในขณะที่แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน 5b ตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยที่เกิดภาวะ TRALI (Nordhagen R *et al.* 1986) ต่อมาแอนติเจนนี้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น HNA-3a ซึ่งจะพบการแสดงออกของแอนติเจนได้บนเซลล์ของเกล็ดเลือด ลิมโฟไซต์ และอวัยวะต่าง ๆ เช่น ไต (kidney) ม้าม (spleen) และเซลล์รก (placental cells) จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า แอนติเจน HNA-3a มีการแสดงออกของแอนติเจนได้หลากหลายแต่ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัด (Bux J. 2002) จนกระทั่งมีการศึกษาเพิ่มเติม ในปัจจุบันพบว่าแอนติเจน HNA-3a นี้มีคุณลักษณะเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ขนาด 70 – 95 กิโลดัลตัน (kiloDalton: kDa) ซึ่งเกิดจากความหลากหลายของยีน choline transporter-like protein-2 gene (*SLC44A2*) เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (amino

acid) ในตำแหน่งที่ 154 จากอาร์จินีน (arginine) เป็นกลูตามีน (glutamine) (Greinacher A *et al.* 2010)

สำหรับแอนติเจน HNA-4a นั้น มีรายงานการค้นพบในปี ค.ศ. 1986 โดย Kline WE และคณะ โดยใช้ชื่อว่า แอนติเจน MART อันเนื่องมาจากซีรัมของผู้บริจาคเลือดเพศหญิงที่เคยตั้งครรภ์มาแล้วสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับแกรนูโลไซต์ (granulocyte) ที่มีแอนติเจนที่ไม่ทราบชนิด และไม่ใช่อันติเจนของ neutrophil ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว ได้แก่ NA1, NA2, NB1, NC1, ND1, NE1, 5a, 5b และ 9a รวมทั้งไม่ใช่แอนติเจนของเม็ดเลือดแดงและ HLA ด้วย (Kline WE *et al.* 1986) แอนติเจนชนิดใหม่สามารถพบได้ในปริมาณมากบนผิวเซลล์แกรนูโลไซต์และโมโนไซต์ (monocyte) และพบได้น้อยบนผิวเซลล์ T lymphocytes อีกทั้งไม่สามารถพบได้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด และ B lymphocytes และจากการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนในสมาชิกของครอบครัวพบว่า แอนติเจนนี้ได้รับมาจากยีนซึ่งมีลักษณะเป็นยีนเด่นทางออโตโซม (autosomal dominant inheritance) และสามารถตรวจพบได้ในสมาชิกของครอบครัวของกลุ่มตัวอย่าง 5 ใน 12 ราย รวมทั้งไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *HLA*, *NA*, *Rh* และ *XY* ด้วย

ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Simsek S และคณะ ได้รายงานการค้นพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน Ond(a) และ Mart(a) ซึ่งทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของ CD11a และ CD11b ที่อยู่ในกลุ่มของ  $\beta 2$  integrin family ในหน่วยย่อย (subunit) ของ  $\alpha L$  และ  $\alpha M$  คณะผู้วิจัยได้นำเอาเทคนิค reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการจำแนกโมเลกุลของ Ond(a) และ Mart(a) ในตำแหน่งของ  $\alpha L$  และ  $\alpha M$  mRNA เพื่อดูการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน  $\alpha L$  ตำแหน่งที่ 2466 (G2466C substitution) ของแอนติเจน Ond(a) และการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ใน  $\alpha M$  ตำแหน่งที่ 302 (G302A substitution) ของแอนติเจน Mart(a) และทำการทดสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนทั้งสองด้วยวิธี monoclonal antibody-specific immobilization of leukocyte antigens, immunofluorescence assay และ immunoprecipitation

ภายหลังได้มีรายงานการตรวจพบแอนติเจนของ neutrophil ชนิดใหม่อีกหลายชนิด ทำให้มีการเรียกชื่อหรือตั้งชื่อแอนติเจนเหล่านี้แตกต่างกันออกไป เกิดความซ้ำซ้อนของแอนติเจนชนิดเดียวกันแต่ใช้ชื่อต่างกันตามชื่อผู้ค้นพบ อีกทั้งการตั้งชื่อแอนติเจนเหล่านั้นไม่ได้สอดคล้องกับยีนและตำแหน่งของยีนที่แสดงความเป็นแอนติเจนนั้นตามหลักการตั้งชื่อของ The Guideline for Human Gene Nomenclature ดังนั้น ในปี ค.ศ. 1998 คณะกรรมการการตั้งชื่อแอนติเจนของเม็ดเลือดของ International Society of Blood Transfusion (ISBT) จึงจัดประชุมผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและผู้ที่ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแอนติเจนของ neutrophil ขึ้น เพื่อร่วมกันจัดระบบการเรียกชื่อแอนติเจนของ neutrophil ให้เป็นมาตรฐานเดียวกันและเพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาในระดับสูงขึ้นไป โดยอาศัย

แนวทางการตั้งชื่อตามรูปแบบของ The guideline for Human Gene Nomenclature กำหนดการเรียกชื่อแอนติเจนของ neutrophil ดังนี้ (ตารางที่ 2.1)

- 1) ชื่อแอนติเจนของ neutrophil จะถูกเรียกใหม่เป็น human neutrophil antigen และใช้อักษรย่อเป็น HNA การกำหนดการเรียกชื่อใหม่นี้ชี้ให้เห็นว่า แอนติเจนเหล่านี้จะแสดงออกบนผิว neutrophil
- 2) ให้ระบุตำแหน่งที่พบแอนติเจนบน membrane ของ neutrophil ด้วยตัวเลขจำนวนเต็ม เช่น แอนติเจนที่พบบน Fc $\gamma$ RIIIb ให้แทนด้วยเลข 1 และเรียกชื่อแอนติเจนของ neutrophil ที่พบบน Fc $\gamma$ RIIIb นี้ว่า HNA-1 และแอนติเจนที่อยู่บน CD177 ให้แทนด้วยเลข 2 เรียกชื่อแอนติเจนนั้นว่า HNA-2 เป็นต้น
- 3) การแยกความหลากหลาย (polymorphism) ของแอนติเจนที่พบบนตำแหน่งเดียวกัน ให้ใช้อักษรภาษาอังกฤษ (ตัวพิมพ์เล็ก) ตามหลังตัวเลขที่แสดงตำแหน่งของแอนติเจน โดยเรียงตามลำดับการค้นพบ เช่น HNA-1a, HNA-1b, ... เป็นต้น
- 4) การระบุชื่อ alleles ที่ถอดรหัส (encode) มานั้น ให้ระบุตามตำแหน่งที่ตั้งของยีนที่แสดงออกถึงแอนติเจนนั้น ๆ แล้วตามด้วยเครื่องหมายดอกจัน (\*) และตัวเลขลำดับการค้นพบยีนหรือแอนติเจน

ตารางที่ 2.1 การเรียกชื่อแอนติเจน HNA ตามระบบของ ISBT working party

(Stroncek D and Bux J. 2002)

Antigen system	Antigen	Location	Fomer name	Alleles
HNA-1	HNA-1a	Fc $\gamma$ RIIIb	NA1	<i>FCGR3B*1</i>
	HNA-1b	Fc $\gamma$ RIIIb	NA2	<i>FCGR3B*2</i>
	HNA-1c	Fc $\gamma$ RIIIb	SH	<i>FCGR3B*3</i>
HNA-2	HNA-2a	CD177 (NB1 glycoprotein)	NB1	<i>CD177*1</i>
HNA-3	HNA-3a	70-95 kDa glycoprotein	5b	Not define
HNA-4	HNA-4a	CD11b (CR3 $\Psi$ )	Mart <sup>a</sup>	<i>CD11B*1</i>
HNA-5	HNA-5a	CD11a (LFA-11 $\Psi$ )	Ond <sup>a</sup>	<i>CD11A*1</i>

CR3 $\Psi$  = C3bi receptor; LFA-1 = leukocyte function antigen-1

\* ISBT HNA nomenclature

จากข้อมูลทั้งหมด ปัจจุบันแอนติเจน HNA มีทั้งหมด 5 ระบบ ประกอบด้วย HNA-1, HNA-2, HNA-3, HNA-4 และ HNA-5

### 1) แอนติเจน HNA ระบบที่ 1 (HNA-1 system)

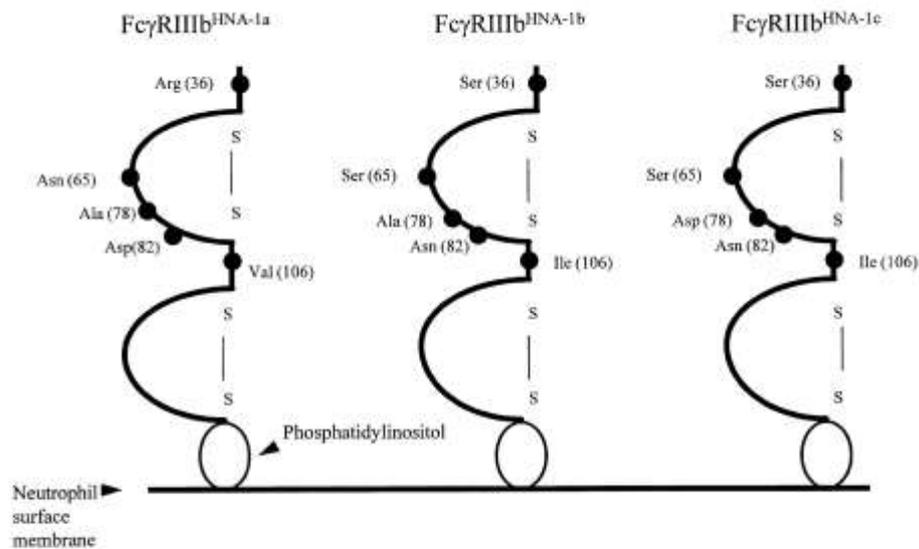
แอนติเจน HNA ระบบที่ 1 (HNA-1) แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c แอนติเจนเหล่านี้เดิมถูกตั้งชื่อว่า แอนติเจน NA1, NA2 และ SH ตามลำดับ (Lalezari P. 1977) แอนติเจนทั้งสามชนิดสามารถพบได้บน  $Fc\gamma RIIIB$  ของเซลล์ neutrophil โดยเฉพาะในกลุ่มของ segmented neutrophil แอนติเจนในระบบนี้จะถูกถอดรหัส (encode) มาจากยีน *Fc\gamma receptor* (*Fc\gamma R / FCGR*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 (1q23) ในบริเวณที่มีกลุ่มของยีน *FCGR* อยู่ 2 กลุ่ม คือ *FCGR2* และ *FCGR3* ยีนในกลุ่ม *FCGR3* จะประกอบด้วย *FCGR3A* และ *FCGR3B* ซึ่งอยู่ใกล้กัน และมีความเหมือนกันสูง (highly homologous) จากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของเบสภายในยีนทั้งสองชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันตรงตำแหน่งที่ 733 นิวคลีโอไทด์ของยีน *FCGR3B* จะเปลี่ยนจาก T มาเป็น C ทำให้เกิดเป็น stop codon ส่งผลให้จำนวนกรดอะมิโน (amino acid) ของ *FCGR3B* น้อยกว่า *FCGR3A* อยู่ 21 ชนิด (ตารางที่ 2.2) (Hillyer C *et al.* 2007) เนื่องจากการแสดงออกของแอนติเจน HNA-1 ถูกควบคุมโดยยีน *FCGR3B* ได้แก่ *FCGR3B\*1*, *FCGR3B\*2* และ *FCGR3B\*3* โดยแอนติเจน HNA-1a จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บน *FCGR3B\*1* allele ในขณะที่ HNA-1b และ HNA-1c จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บน *FCGR3B\*2* allele และ *FCGR3B\*3* allele ตามลำดับ ดังนั้นการจำแนกชนิดของแอนติเจน HNA-1 จึงอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *FCGR3B* ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 36, 65, 78, 82 และ 106 (รูปที่ 2.1) ความแตกต่างระหว่าง HNA-1a และ HNA-1b อยู่ที่ตำแหน่งที่ 36, 65, 82 และ 106 ในขณะที่ความแตกต่างระหว่าง HNA-1b และ HNA-1c จะอยู่ในตำแหน่งที่ 78 เพียงตำแหน่งเดียว โดยกรดอะมิโนที่บ่งชี้ความจำเพาะของ HNA-1b คือ Ala และ HNA-1c คือ Asp จากความแตกต่างของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่าง ๆ ทำให้แต่ละ allele จะมีลำดับเบสบริเวณ exon 3 ของ *FCGR3B* แตกต่างกัน เช่น HNA-1a และ HNA-1b จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกันในตำแหน่ง 141, 147, 227, 277 และ 349 และลำดับของเบสที่ใช้แยก HNA-1c ออกจาก HNA-1a และ HNA-1b อยู่ที่ตำแหน่ง 266 (Kissel K *et al.* 2000; Stroncek D. 2002) จากความแตกต่างดังกล่าวจึงนำมาสู่การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจน HNA ทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคต่าง ๆ (Flesch BK *et al.* 2002; Costa E *et al.* 2004; Abou-Chaker K *et al.* 2009; Norcia AM *et al.* 2009)

ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *FCGR3A* และ *FCGR3B*

Molecule	Gene	Base Pair Position										
		141	147	227	266	277	349	473	505	559	641	733
FcγRIIIB HNA-1a	<i>FCGR3B*1</i>	AGG	CTC	AAC	GCT	GAC	<b>GTC</b>	GAC	CAC	GTT	TCT	TGA*
FcγRIIIB HNA-1b	<i>FCGR3B*2</i>	AGC	<b>CTT</b>	AGC	GCT	AAC	ATC	GAC	CAC	GTT	TCT	TGA*
FcγRIIIB HNA-1c	<i>FCGR3B*3</i>	AGC	<b>CTT</b>	AGC	<b>GAT</b>	AAC	ATC	GAC	CAC	GTT	TCT	TGA*
FCGR3A	<i>FCGR3A</i>	AGG	CTC	AGC	GCT	GAC	ATC	<b>GGC</b>	<b>TAC</b>	<b>TTT</b>	<b>TTT</b>	<b>CGA</b>

\* Stop codon

Differences among genes are in bold



รูปที่ 2.1 ความแตกต่างของกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อ HNA-1 บน FcγRIIIB

(Lucas GF and Metcalfe P. 2000)

จากการศึกษาของ Nagarajan S และคณะ ซึ่งให้เห็นว่า ความหลากหลายของ FcγRIIIB มีผลต่อการทำงานของ neutrophil เซลล์ที่มีการแสดงออกแบบ homozygous NA2 (HNA-1bb) จะมีความสามารถในการจับ (affinity) กับ IgG3 ได้ต่ำกว่าเซลล์ที่เป็น homozygous NA1 (HNA-1aa) (Nagarajan S *et al.* 1995) ดังนั้น เซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil ของคนที่เป็น homozygous NA2 จึงมีความสามารถในการกำจัด (phagocyte) เชื้อแบคทีเรียและเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วย anti-Rh (IgG1 และ IgG3) ได้ต่ำกว่าคนที่เป็น homozygous NA1 (Salmon JE *et al.* 1990)

เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่เป็นโรค chronic granulomatous ซึ่งมียีนแบบ homozygous *NA2* และ heterozygous *NA* จะพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อในทางเดินอาหาร (gastrointestinal infection) ได้สูงกว่าคนที่ไม่มียีน *NA2* (Foster CB *et al.* 1998)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ชี้ให้เห็นถึงความบกพร่องในการแสดงออกของ *FcγRIIIB* จะส่งผลให้เกิดการขาดหายไปของแอนติเจน HNA-1a และ -1b โดยเฉพาะบนผิวเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะ paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) ซึ่งจะมีการขาดหายไปของ GPI-linked glycoproteins ทำให้ granulocyte ของผู้ป่วยมีจำนวนของ *FcRIIIB* และ HNA-1 ลดลง (Huizinga TW *et al.* 1990; Huizinga TW *et al.* 1990) และจากการวิเคราะห์ยีน *FcγRIIIB* ของกลุ่มตัวอย่าง 21 ราย ซึ่งมาจาก 14 ครอบครัวที่ตรวจพบความบกพร่องของ *FcγRIIIB* ผลการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดไม่พบทั้งยีน *FcγRIIIB* และยีน *FcγRIIC* ซึ่งอยู่ติดกันด้วย (de Haas M *et al.* 1995) ด้วยเหตุนี้ จึงมีรายงานการตรวจพบลักษณะการขาดหายไปของแอนติเจน HNA-1 หรือที่เรียกว่า HNA-1 null ในชนผิวขาว ประมาณ 0.1% (Fromont P *et al.* 1992)

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในระบบนี้สามารถทำให้เกิดภาวะ alloimmune neonatal neutropenia (ANN), autoimmune neutropenia (AIN), transfusion related acute lung injury (TRALI) (Han TH *et al.* 2006; Bux J. 2008; Gottschall JL *et al.* 2011) ภาวะดังกล่าวจะทำให้ผู้ป่วยเกิดความผิดปกติของร่างกายได้แตกต่างกัน บางรายอาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต

## 2) แอนติเจน HNA ระบบที่ 2 (HNA-2 system)

แอนติเจนในระบบนี้มีเพียงชนิดเดียว คือ HNA-2a ซึ่งมีชื่อเดิมว่า NB1 โมเลกุลที่แสดงออกถึงความเป็นแอนติเจนนี้จะอยู่ที่ตำแหน่งของ CD177 บนผิวเซลล์ของ neutrophil ภายใต้การควบคุมของยีน *CD177\*1* บนโครโมโซมคู่ที่ 19 (19q13.2) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน NB1 โดย Kissel K และคณะ ชี้ให้เห็นว่า NB1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ *Ly6* superfamily gene หรือที่เรียกว่า urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) หรือ พิษงู (snake toxin) (Kissel K *et al.* 2001) ในส่วนของยีน *CD177* ที่สามารถแปลรหัสได้ (coding region) จะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ จำนวน 1,311 base pair (bp) ซึ่งจะถูกถอดรหัสมาเป็นโปรตีน จำนวน 416 ตัว จากการศึกษาพบว่าโปรตีน NB1 glycoprotein (gp) นี้จะมีลักษณะที่แตกต่างจากโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มของ *Ly6* คือประกอบด้วยตำแหน่งของ cystein-rich domain จำนวน 2 domains แต่ละ domain จะมีจำนวนของ cystein เพียง 6 ตัว ในขณะที่โปรตีนในกลุ่มของ *Ly6* ชนิดอื่น ๆ จะมี cystein-rich domain เพียง 1 domain ยกเว้น uPAR ซึ่งจะมี 3 domains นอกจากนี้ยังพบว่า NB1 นั้นจะมีตำแหน่งของ N-linked glycosylation site จำนวน 3 ตำแหน่ง และตำแหน่งของ O-site สำหรับ

การยึดจับของ glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor อีก 1 ตำแหน่งด้วย อย่างไรก็ตาม การทำงานของโปรตีนทั้งสามชนิดยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน

การแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a จะพบได้ทั้งบนผิวเซลล์ neutrophil, neutrophilic myelocyte และ metamyelocyte รวมทั้งยังสามารถพบได้บน plasma membrane และ secretory vesicles อีกด้วย (Goldschmeding R *et al.* 1992) โดยจะพบการแสดงออกบนผิวเซลล์ neutrophil ของผู้หญิงได้มากกว่าผู้ชาย และในผู้หญิงจะพบการแสดงออกลดลงตามอายุ ในขณะที่ในเพศชาย จะมีการแสดงออกของแอนติเจนคงที่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) น่าจะมีผลต่อการแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a ซึ่งตรงกับผลการวิจัยของ Caruccio L และคณะ ที่พบการแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a บนผิวเซลล์ neutrophil ของหญิงตั้งครรภ์ได้มากกว่าใน ผู้บริจาคเลือดเพศหญิงด้วย (Caruccio L *et al.* 2003) ในทางตรงข้าม จากการศึกษาของ Foster CB และคณะ ในปี ค.ศ. 1998 และการศึกษาของ Goldschmeding R และคณะ ในปี ค.ศ. 1992 พบว่าการแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a จะลดลงในผู้ป่วยที่มีภาวะ PNH และ chronic myelogenous leukemia (CML) แต่ยังไม่ทราบความสำคัญทางคลินิกของการไม่แสดงออกของแอนติเจน NB1 บนผิวเซลล์ neutrophil (Goldschmeding R *et al.* 1992; Foster CB *et al.* 1998) รวมทั้งยังไม่พบการเพิ่มขึ้นของความเสียหายจากการติดเชื้อหรือเกิดภาวะ autoimmune disorder ในผู้ที่ไม่มีแอนติเจน NB1 อย่างไรก็ตาม เคยมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน NB1 ในมารดาที่ไม่มีการแสดงออกของแอนติเจน NB1 (NB1-negative mother) ซึ่งตั้งครรภ์บุตรที่มีแอนติเจน NB1 (NB1-positive neonate) ส่งผลให้ทารกแรกคลอดเกิดภาวะ alloimmune neutropenia การให้ ส่วนประกอบของเลือดที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ NB1 (HNA-2a) สามารถทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ febrile transfusion reaction และ TRALI ได้เช่นเดียวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HNA-1 (Bux J. 2001; Fadeyi EA *et al.* 2007) อีกทั้งยังสามารถทำให้เกิดภาวะ drug-induced neutropenia และ graft failure ภายหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) ได้ด้วย (Pocock CF *et al.* 2001)

### 3) แอนติเจน HNA ระบบที่ 3 (HNA-3 system)

ปัจจุบัน แอนติเจนในระบบนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ HNA-3a มีชื่อเดิมว่า 5b และ HNA-3b ชื่อเดิมคือ 5a แอนติเจน HNA-3a เป็นแอนติเจนชนิดแรกที่ถูกลักพบในปี ค.ศ. 1964 โดย van Leeuwen A และคณะ แอนติเจนนี้จะมีการแสดงออกที่ตำแหน่ง 70 - 95 kDa ของ glycoprotein พบได้ทั้งบนผิวเซลล์ neutrophil และ lymphocyte (Van Leeuwen A *et al.* 1964; Reil A *et al.* 2011) จากการศึกษาทางด้าน cytogenetic พบว่าแอนติเจนในระบบนี้จะถูกสร้างขึ้นโดยยีนที่อยู่บน

โครโมโซมคู่ที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่า แอนติเจนในระบบนี้ (HNA-3a/3b) เกิดจากความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ของยีน *choline transporter-like protein-2 (SLC44A2)* ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 154 จาก glutamine เป็น arginine (461 G>A; Arg154Gln) (Greinacher A *et al.* 2010; Reil A *et al.* 2011)

มีรายงานวิจัยหลายฉบับชี้ให้เห็นว่า แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HNA-3a สามารถทำให้เกิดภาวะ febrile transfusion reaction และ neonatal alloimmune neutropenia ได้เช่นเดียวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในระบบที่ 1 และ 2 อีกทั้งยังสามารถทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ TRALI อย่างรุนแรงได้ด้วย (Davoren A *et al.* 2003; Silliman CC *et al.* 2007; Reil A *et al.* 2011) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HNA-3 นี้สามารถพบได้ในพลาสมาที่ปนอยู่ในส่วนประกอบของเลือดรับบริจาค โดยเฉพาะในพลาสมาสดแช่แข็ง (fresh frozen plasma; FFP) และเกล็ดเลือด (platelet) ที่เตรียมมาจากเลือดของผู้บริจาคเพศหญิงที่เคยตั้งครรภ์มาก่อน (Davoren A *et al.* 2003)

#### 4) แอนติเจน HNA ระบบที่ 4 (HNA-4 system)

แอนติเจนในระบบนี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1986 โดย Kline WE และคณะ โดยเรียกชื่อแอนติเจนนี้ว่า Mart<sup>a</sup> ต่อมาจึงเปลี่ยนเป็น HNA-4a (Kline WE *et al.* 1986) จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าแอนติเจนนี้อยู่บน  $\beta$ 2-integrin ที่อยู่ในกลุ่มของ Leu-CAM family แอนติเจน HNA-4a เกิดจากความหลากหลายของ CD11b (C3bi receptor: CR3 $\Psi$ ) ในตำแหน่งที่ 302 (G302A) บนผิวเซลล์ของ neutrophil ส่งผลให้เกิดการแทนที่ของอาร์จินีน (arginine) กับฮิสทีดีน (histidine) ในตำแหน่งที่ 61 และยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจนนี้คือ *CD11B\*1* (Simsek S *et al.* 1996) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-4a สามารถทำให้เกิดภาวะ ANN และ AIN (Fung YL *et al.* 2003)

#### 5) แอนติเจน HNA ระบบที่ 5 (HNA-5 system)

แอนติเจนในระบบนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ HNA-5a ซึ่งอยู่ในส่วนของ  $\alpha$  chain บน CD11a (LFA-1) ของ  $\beta$ 2-integrin ซึ่งมีการแสดงออกบนเซลล์ leukocyte และทำหน้าที่ในการยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียง (cell adhesion molecule) แอนติเจนนี้ถูกค้นพบโดย Decary F และคณะ ด้วยการใช้นิ่วของผู้ป่วยชื่อ “OND” ซึ่งมีภาวะ hypoplastic anemia และได้รับการรักษาด้วยการให้เกล็ดเลือดติดต่อกันมาเป็นเวลานานมาทำการทดสอบหาความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีของเม็ดเลือดขาว ดังนั้น จึงตั้งชื่อแอนติเจนนี้ว่า Ond<sup>a</sup> ต่อมาจึงถูกเปลี่ยนเป็น HNA-5a (Decary F *et al.* 1979) จากการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจนนี้คือ

ยีน *CD11A\*1* และแอนติเจน HNA-5a เกิดจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2466 (G2466T) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 776 จากอาร์จินีน (arginine) เป็นทรีโอนีน (threonine) (Simsek S *et al.* 1996) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-5a สามารถทำให้เกิดภาวะ ANN และ TRALI ได้

## 2.2 เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน HNA-1

ในอดีตการตรวจหา HNA-1 นิยมใช้วิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) โดยในปี ค.ศ. 1986 Hadley H และคณะ ได้ประยุกต์ใช้หลักการ chemiluminescence ร่วมกับวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil เรียกวิธีการตรวจนี้ว่า granulocyte chemiluminescence test (GCLT) เพื่อใช้ในการตรวจหา anti-granulocyte antibodies ในเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะ unexplained neutropenia โดยการวัดการตอบสนองของเม็ดบอลลึกของ monocyte ต่อ antibody-coated granulocytes เปรียบเทียบกับการทดสอบโดยวิธี granulocyte indirect immunofluorescence (GIFT) ซึ่งริเริ่มใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1977 คณะผู้วิจัยได้ชี้ให้เห็นว่าวิธี GCLT เป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำได้ง่าย และมีความไว (sensitivity) สูงกว่าวิธี GIFT (Verheugt FW *et al.* 1977; Hadley AG *et al.* 1986) และได้ถูกพัฒนามาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด และแกรนูโลไซต์ เพื่อวินิจฉัยภาวะทางคลินิกที่สำคัญ เช่น การตรวจหาแอนติบอดีที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN), alloimmune thrombocytopenia และ alloimmune neutropenia เป็นต้น (Hadley AG *et al.* 1992)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Bux J ได้ใช้วิธี granulocyte agglutination test (GAT) ในการตรวจหาความสำคัญทางคลินิกของแอนติเจนและแอนติบอดีของนิวโทรฟิลและอธิบายลักษณะ granulocyte specific alloantigen (NA1) และในปีเดียวกัน ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ HNA โดยการเปรียบเทียบการทดสอบจาก 3 วิธี ได้แก่ GAT, GCLT และ GIFT โดยพบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลการตรวจที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันและสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ในราคาที่ไม่แพง อย่างไรก็ตาม แต่ละวิธีก็มีข้อเสียในการตรวจ คือ GAT มีข้อจำกัดในการตรวจไม่พบในกรณีที่มี incubation period ยาวนาน ส่วน GIFT จะมีข้อเสียในการเกิด false-positive และวิธี GCLT จะมีข้อเสียตรงที่ไม่สามารถตรวจแอนติบอดีที่เป็น IgM ได้ (Bux J. 1996)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 Zupanska B และคณะ ได้ประยุกต์ใช้วิธี GIFT ร่วมกับการใช้เครื่องนับเซลล์ชนิด flow cytometer มาใช้ในการศึกษาอัตราเสี่ยงต่อการเกิดแอนติบอดีต่อแอนติเจน HNA-1a และ HNA-1b ในหญิงตั้งครรภ์ จำนวน 1,038 ราย ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ neonatal neutropenia ในเด็กแรกเกิด ผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีจากแม่ที่เป็น HNA-1a/b จำนวน 548

ราย ให้ผลลบต่อแอนติเจนของลูกทุกราย ส่วนแอนติบอดีที่ได้มาจากแม่ชนิดที่เป็น HNA-1a/a และ HNA-1b/b นั้นให้ผลบวกกับแอนติเจนทุกตัว จึงสรุปได้ว่า HNA-1a/a และ HNA-1b/b เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดภาวะ neonatal neutropenia (Zupanska B *et al.* 2001)

ผลจากข้อจำกัดของการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาที่ไม่สามารถใช้ในการแยกโฮโมไซกัส (homozygous) ออกจากเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้และจากความก้าวหน้าของเทคโนโลยี ทำให้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหา HNA-1 มาเป็นการตรวจทางโมเลกุล (molecular technique) โดยเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจหา HNA ได้แก่ เทคนิค polymerase chain reaction-sequence based typing (PCR-SBT) และ polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) เทคนิคที่จัดว่าเป็นเทคนิคที่มีมาตรฐานสูงสุด ได้แก่ วิธี PCR-SBT ซึ่งสามารถหาลำดับเบสได้โดยใช้สีเรืองแสงมาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี รวมทั้งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ซึ่งในระยะแรกได้อาศัยหลักการของการใช้สีเรืองแสง (fluorescent dye) 4 ชนิดมาต่อกับโมเลกุลของ primer เพื่อแยกไปทำปฏิกิริยาทั้ง 4 แล้วนำไปแยกโดยขบวนการ electrophoresis โดยขึ้น DNA แต่ละชนิดที่ได้จากปฏิกิริยานั้นจะมีขนาดไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับว่าจะหยุดสังเคราะห์ที่เบสตัวใดในสายนั้น นอกจากนี้ DNA สายที่มีการหยุดสังเคราะห์ที่เบสแต่ละตัวจะมีสีเรืองแสงที่ติดอยู่แตกต่างกันด้วย ดังนั้น เมื่อขึ้น DNA สายที่มีขนาดสั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมาเครื่องตรวจจับที่เป็นระบบแสงเลเซอร์จะจับความยาวช่วงคลื่นของสีเรืองแสงแต่ละตัวได้ และอาจจะบันทึกผลที่ออกมาว่าแถบ DNA แถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีปลายเบสตัวใด และตรวจจับแถบถัดมาเรื่อย ๆ และเก็บข้อมูลไว้โดยคอมพิวเตอร์ เมื่อจบการทำ electrophoresis ก็สามารถอ่านข้อมูลลำดับเบสได้ทันทีเพื่อตรวจดูว่าลำดับเบสที่ได้ตรงกับ HNA ตัวใด ต่อมาในปัจจุบันการตรวจหา HNA โดยวิธี PCR-SBT นี้ได้อาศัยเครื่องมืออัตโนมัติ จึงสามารถหาลำดับของเบสภายหลังจากการขยายสัญญาณของยีนด้วยวิธี PCR ได้เลย

สำหรับเทคนิค polymerase chain reaction with sequence specific primer (PCR-SSP) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง โดยอาศัยวิธีการนี้ในปี ค.ศ. 1996 Hessner MJ และคณะได้นำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน NA กับผลของภูมิคุ้มกันของยีนในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาค โดยใช้การแยก NA1 และ NA2 ออกจากกันด้วยความแตกต่างของเบสที่ตำแหน่ง 141, 147, 227 และ 277 เขาได้สรุปให้เห็นว่าเทคนิค PCR-SSP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกชนิดของยีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตัวเดียว (single nucleotide polymorphism: SNP) และเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและความแม่นยำสูง (Hessner MJ *et al.* 1996) ดังนั้น ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาวิธี PCR-SSP มาใช้ในการวิจัยทางด้านนี้มากขึ้น

การตรวจหาชนิดของแอนติเจนของ neutrophil มีหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียในการตรวจที่แตกต่างกัน การเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับความต้องการใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

## 2.2.1 วิธีการตรวจทางนำเหลืองวิทยา (serology method) ได้แก่

### 1) วิธี Granulocyte Chemiluminescence Test (GCLT)

อาศัยหลักการ luminescence ที่เกิดจากปรากฏการณ์ของการปล่อยพลังงาน (emission process) ของอะตอมหรือโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยพลังงานในรูปแบบต่าง ๆ หรือปฏิกิริยาเคมี ทำให้เกิดการดูดซับพลังงานไว้ในโมเลกุล ส่งผลให้โมเลกุลของสารที่ถูกกระตุ้นไม่คงตัว และเกิดการคายความร้อนออกมาเมื่อกลับสู่สภาวะพื้นฐาน (ground state) พลังงานที่ถูกคายออกมาจะอยู่ในรูปของการเรืองแสงซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การประกบแผ่นฟิล์มเพื่ออ่านผล หรือการใช้เครื่องเฉพาะที่เรียกว่า luminometer ข้อดีของวิธี chemiluminescence คือ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติเพื่อให้เกิดความรวดเร็ว ความจำเพาะ และความไวในการตรวจที่สูงยิ่งขึ้น โดยวิธีการนี้จะลดขั้นตอนในการล้างลงไปเพราะเป็นการแยกตัวทดสอบโดยใช้ประจุแม่เหล็กไฟฟ้าแทน

ในปี ค.ศ. 1994 Lucas GF ได้นำวิธี GCLT มาตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil เพื่อเปรียบเทียบกับวิธี granulocyte immunofluorescence test (GIFT) และ granulocyte agglutination test (GAT) ในผู้ป่วย 213 ราย ที่มีความผิดปกติของ neutrophil ผลการทดลองสรุปได้ว่าวิธี GCLT ให้ผลการตรวจไม่แตกต่างจาก GIFT และ GAT ทั้ง 3 วิธีสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีของ neutrophil ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับความสะดวกและความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ แต่ส่วนใหญ่มักใช้ร่วมกันทั้ง 2 วิธี (Lucas GF. 1994) ผลงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Bux J และ Chapman J ซึ่งได้จากการประชุมปฏิบัติการครั้งที่ 2 ของการประชุม International Granulocyte Serology Workshop โดยการเปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil ด้วยเทคนิค GIFT, GAT และ MIAGA จากผลการทดลองของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการประชุม จำนวน 13 แห่ง พบว่า 2 ใน 3 ของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการประชุมสามารถใช้วิธี GIFT เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-1 ได้อย่างถูกต้อง ในขณะที่ห้องปฏิบัติการบางแห่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธี GAT ผู้วิจัยสรุปว่าควรนำทั้งสองเทคนิคมาใช้ควบคู่กันจึงจะดีที่สุด (Bux J and Chapman J. 1997)

### 2) วิธี Granulocyte Immunofluorescence Test (GIFT)

เป็นการประยุกต์ใช้หลักการของเทคนิค indirect immunofluorescence มาพัฒนาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจนของ neutrophil โดยในปี ค.ศ. 1977 Vergheugt FW และ

คณะ ได้พัฒนาเทคนิคนี้ขึ้นมา และชี้ให้เห็นถึงปัญหาของการประยุกต์ใช้เทคนิค GIFT ที่เกิดจากความไม่จำเพาะของสารเรืองแสงบนผิว granulocyte ที่ยึดเกาะกับผิวเซลล์ไม่แน่น อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้แนะนำแนวทางในการแก้ไขด้วยการรักษาสภาพของเซลล์ด้วยสาร paraformaldehyde ก่อนการทดลอง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำ (Verheugt FW *et al.* 1977)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Bux J ได้ใช้วิธี GIFT และ GAT ในการตรวจหาแอนติบอดีของ neutrophil ทั้งชนิด IgG และ IgM ในผู้ป่วยภาวะ AIN ระยะต่าง ๆ แม้ว่าวิธี GIFT จะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และมีความจำเพาะสูง แต่มีข้อเสียคือสามารถเกิดผลบวกปลอมได้ (Bux J. 1996) และในปี ค.ศ. 1998 Bux J ก็ได้ใช้วิธี GIFT ในการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกของภาวะ AIN ในเด็กทารกที่มีอายุน้อยกว่า 3 ปี จำนวน 240 ราย อีกครั้ง ผลการศึกษาสามารถตรวจพบ antineutrophil antibody ได้ในผู้ป่วยทั้ง 240 ราย (100%) ผู้วิจัยชี้ให้เห็นว่าการใช้วิธี GIFT เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ neutrophil เป็นวิธีที่เหมาะสมและน่าเชื่อถือ (Bux J *et al.* 1998) จึงนำมาสู่การศึกษาอีกหลายฉบับ เช่น การศึกษาของ Bruin M และคณะ เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อภาวะ AIN ในผู้ป่วยเด็กจำนวน 28 ราย โดยใช้เทคนิค indirect granulocyte immunofluorescence ผลการศึกษพบว่า ในผู้ป่วยกลุ่ม primary AIN ตรวจพบแอนติบอดี 3 ชนิด ได้แก่ anti-NA1 จำนวน 16 ราย anti-NA2 จำนวน 2 ราย anti-Fc $\gamma$ RIIB จำนวน 1 ราย และไม่สามารถสรุปได้อีก 2 ราย ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่ม secondary AIN จำนวน 7 ราย ตรวจพบเฉพาะ anti-Fc $\gamma$ RIIB เพียงชนิดเดียว (Bruin M *et al.* 2005) และงานวิจัยของ Zupanska B และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 ได้พัฒนาใช้วิธี GIFT ร่วมกับเครื่องนับเซลล์ชนิด flow cytometer เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของ anti-HNA-1a และ anti-HNA-1b ในหญิงตั้งครรภ์ จำนวน 1,038 ราย ที่เป็นสาเหตุทำให้ทารกเกิดภาวะ ANN ผลการทดลองพบว่า anti-HNA-1a และ anti-HNA-1b เป็นสาเหตุก่อให้เกิดภาวะ ANN ในทารกแรกคลอดทั้งหมด (Zupanska B *et al.* 2001)

### 3) วิธี Monoclonal Antibody Immobilization of Granulocyte Antigen (MAIGA)

การนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจแอนติเจนของ neutrophil มีใช้ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1993 โดย Bux J และคณะ จากการใช้ CD16 เป็นโมโนโคลนัลแอนติบอดีตัวแรก (Bux J *et al.* 1993; Zupanska B *et al.* 2001) ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 Lucas G และคณะ ได้นำวิธี MAIGA มาใช้ในการทดสอบมาตรฐานของการตรวจในการประชุมเชิงปฏิบัติการ Granulocyte Immunology Workshop ครั้งที่ 4 โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ตรวจ ได้แก่ CD11/18, CD16 และ CD177 (Lucas G *et al.* 2002) ผลการทดสอบพบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะสูงมาก แต่เนื่องจากวิธีนี้มีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่ค่อยนิยมนำมาตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไป

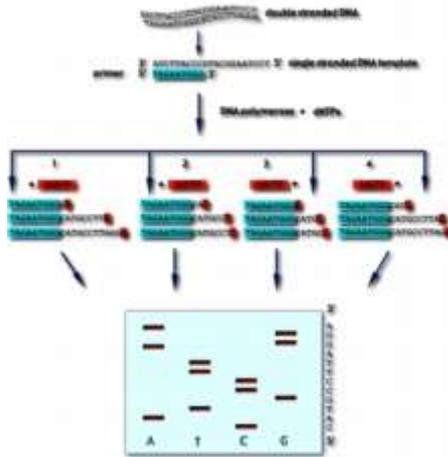
จากรายงานที่ผ่านมาจึงสรุปได้ว่า การตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ทางวิธี serology นิยมใช้วิธี GAT และ GIFT มากกว่าวิธี MAIGA แต่เนื่องจากวิธีทาง serology ไม่สามารถแยก homozygous กับ heterozygous ออกจากกันได้ ดังนั้น การศึกษาถึงระดับยีนของแอนติเจนของ neutrophil โดยใช้วิธีทาง molecular จึงได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากสามารถบอกได้อย่างละเอียดว่ายีนอยู่ในตำแหน่งไหนและมีการเรียงตัวของลำดับเบสอย่างไร ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

## 2.2.2 วิธีการตรวจทางอณูชีวโมเลกุล (molecular method)

### 1) Polymerase Chain Reaction-Sequence Based Typing (PCR-SBT)

เป็นการหาลำดับเบสโดยใช้สีเรืองแสง (fluorescent dye) มาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ โดยใช้หลักการติดฉลากเบสของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน แล้วนำเบสเหล่านี้เข้าไป (incorporate) ในสายดีเอ็นเอใหม่โดยใช้ DNA polymerase จากนั้นจึงนำไปเคลื่อนผ่านเจลที่มีความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าด้วยหลักการ electrophoresis ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกรวบรวมด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงแล้วแปลงเป็นสัญญาณดิจิทัล ส่งไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยขบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นอย่างอัตโนมัติภายใต้การทำงานของเครื่อง DNA Sequencer สามารถอ่านข้อมูลลำดับเบสทำให้ทราบว่าเป็น HNA ชนิดใดได้ทันที (รูปที่ 2.2)

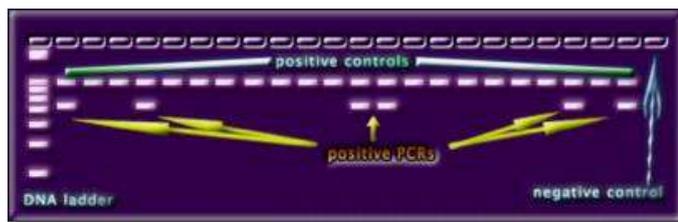
จากงานวิจัยที่ผ่านมา การนำเทคนิค PCR-SBT มาใช้ในการตรวจหาชนิดของ HNA ยังมีใช้น้อย ส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษาลำดับเบสของ HNA-1 เท่านั้น (Steffensen R *et al.* 1999; Matsuo K *et al.* 2000) อย่างไรก็ตาม ผลงานวิจัยล่าสุดที่ชี้ให้เห็นถึงความก้าวหน้าของการศึกษาทางด้านความหลากหลายของแอนติเจน HNA มาจากการศึกษา whole genome sequencing (WGS) data โดยการใช้ next-generation sequencing technology เพื่อตรวจหา HNA-1 ถึง -5 เปรียบเทียบกับผลการตรวจโดยวิธี PCR-SSOP, PCR-SSP และ PCR-RFLP ซึ่งพบว่า next-generation sequencing สามารถให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและรวดเร็ว (Chu HT *et al.* 2013)



รูปที่ 2.2 หลักการการตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing based typing (SBT)  
(Velickovic Z. 2010 : Online) (Velickovic Z. 2010)

## 2) Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primer (PCR-SSP)

เป็นเทคนิคของการเพิ่มปริมาณ DNA โดยการใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันของแต่ละ allele เข้าไปจับกับ DNA ถ้า primer จับกับ target DNA ได้ ก็จะมีการเพิ่มปริมาณของ DNA ขึ้นมา และภายหลังการทำ electrophoresis เพื่อตรวจผลจากแผ่นเจลก็จะพบ PCR product ที่มีขนาดที่จำเพาะกับแต่ละ allele ได้ แต่ถ้า primer ที่ใช้ไม่จำเพาะกับ target DNA ก็จะจับกันไม่ได้และจะไม่มีการเพิ่มปริมาณของ PCR product ขึ้นมา ทำให้ไม่มีการปรากฏของแถบ ภายหลังจากการทำ electrophoresis (รูปที่ 2.3) เนื่องจากเทคนิค PCR-SSP เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง ดังนั้น จึงเป็นที่นิยมในการนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจน HNA กันอย่างแพร่หลาย (Kissel K *et al.* 2000; Sachs UJ *et al.* 2005; Han TH *et al.* 2006; Han TH and Han KS. 2006; de La Vega Elena CD *et al.* 2008; Norcia AM *et al.* 2009)



รูปที่ 2.3: หลักการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะ โดยวิธี PCR-SSP (Velickovic Z. 2010 : Online)  
(Velickovic Z. 2010)

ในปี ค.ศ. 1996 Hessner HJ และคณะ ได้นำวิธี PCR-SSP ไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน NA กับผลของภูมิคุ้มกันของยีนในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาค โดยใช้การแยก NA1 และ NA2 ออกจากกันด้วยความแตกต่างของเบสที่ตำแหน่ง 141, 147, 227 และ 277 และได้สรุปให้เห็นว่าเทคนิค PCR-SSP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกชนิดของยีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตัวเดียว (single nucleotide polymorphism: SNP) และเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและความแม่นยำสูง (Hessner MJ *et al.* 1996) ต่อมาได้มีการนำเทคนิค PCR-SSP มาใช้ในการศึกษาการกระจายตัวของยีน HNA ในเชื้อชาติต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย (Kissel K *et al.* 2000; Abid S *et al.* 2001; Flesch BK *et al.* 2002; de La Vega Elena CD *et al.* 2008; Norcia AM *et al.* 2009; Changsri K *et al.* 2014) รวมทั้งนำมาใช้ร่วมกับวิธีอื่น ๆ เพื่อหาสาเหตุของการเกิดภาวะ neutropenia ในผู้ป่วย เช่น จากงานวิจัยของ Han TH และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ที่ได้ศึกษาหาแอนติบอดีในซีรัมมารดาและทารกที่มีภาวะ ANN ร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี mixed passive hemagglutination assay (MPHA) และหาชนิดของแอนติเจน neutrophil ทั้งของมารดาและทารกโดยวิธี PCR-SSP พบว่า ในทารกจะพบทั้งแอนติเจน HNA-1a และ HNA-1b ส่วนในมารดามีเฉพาะแอนติเจน HNA-1b และผลการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมของทั้งคู่พบ anti-HNA-1a ทั้งนี้เนื่องมาจากมารดาไม่มีแอนติเจนดังกล่าว เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากลูกจึงสร้าง anti-HNA-1a ขึ้นมา และเมื่อตั้งครรถ์ครั้งต่อไป แอนติบอดีที่มีอยู่ในเลือดแม่ (IgG) จึงผ่านทางรกมาจับกับ neutrophil ของลูก ทำให้ neutrophil ของลูกถูกทำลาย (Han TH *et al.* 2006)

### 2.3 การกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1

รายงานการศึกษารายการกระจายตัวของแอนติเจน HNA มีความสำคัญต่อกระบวนการจัดทำฐานข้อมูลผู้บริจาคเพื่อใช้ในการคัดเลือกผู้บริจาคให้แก่ผู้ป่วย การคัดเลือกเซลล์เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรอง และยังสามารถใช้ในการทำนายโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ alloimmunization ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น รายงานวิจัยในปี ค.ศ. 2000 ของ Kissel K และคณะ ที่ศึกษาเกี่ยวกับความถี่ของ HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c ในประชากรประเทศแอฟริกา จำนวน 99 ราย ชาวอเมริกา จำนวน 56 ราย ชาวกานา จำนวน 27 ราย และชาวจีน จำนวน 138 ราย คณะผู้วิจัยพบว่า ประชากรในประเทศแอฟริกาและอเมริกาจะพบความถี่ของ HNA-1b ได้บ่อยกว่า HNA-1a ซึ่งตรงข้ามกับชาวจีนที่พบความถี่ของ HNA-1a มากกว่า HNA-1b นอกจากนี้ ยังพบความถี่ของ HNA-1c ในประชากรประเทศแอฟริกาและอเมริกา อีกด้วย โดยพบว่าในคนที่ HNA-1c positive จะพบ HNA-1b positive ด้วยเช่นกัน และจากการค้นพบครั้งนี้จึงสนับสนุนความคิดที่ว่า HAN-1c มีผลมาจากการกลายพันธุ์ของ HNA-1b (Kissel K *et al.* 2000) และจากรายงานวิจัย

เกี่ยวกับความถี่ของยีน HNA-1 ในชนกลุ่มน้อยของไต้หวัน ในปี ค.ศ. 2001 โดย Chu CC และคณะ ทำให้พบว่าประชากรที่ศึกษาจะมีการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 null มากที่สุดในชนกลุ่ม Ami (19.8%) รองลงมาคือชนกลุ่ม Hakka (5.7%), ชนกลุ่ม Puyuma (3.5%) และชนกลุ่ม Rukai (3.2%) ตามลำดับ ส่วน HNA-1a นั้นพบความถี่ใกล้เคียงกัน ยกเว้น ความถี่ของ HNA-1b ที่พบได้น้อยในชนกลุ่ม Ami และ Puyuma (25.5% และ 27.0% ตามลำดับ) และจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าไม่พบความถี่ของ HNA-1c ในประชากรไต้หวัน (Chu CC *et al.* 2001)

การศึกษาความถี่ของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ มีรายงานอย่างต่อเนื่องต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Moritz E และคณะ จึงได้รวบรวมรายงานการตรวจพบความถี่ของ HNA ทั้ง 5 ระบบ ในแต่ละเชื้อชาติ และชี้ให้เห็นว่าการกระจายตัวของ HNA แต่ละระบบในแต่ละเชื้อชาตินั้นมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3) (Moritz E *et al.* 2009) เช่น การกระจายตัวของ HNA-1a ในประชากรของประเทศแถบเอเชีย พบได้ประมาณ 44 - 90% โดยพบการกระจายตัวในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ดังนี้ ชาวจีน 90% ชาวอินเดียในทวีปเอเชีย (Asian Indians) 44% ญี่ปุ่น 88% และเกาหลี 78% สำหรับยีน HNA-1b นั้น พบว่ามีการกระจายตัวประมาณ 51 - 83% โดยพบในชาวจีน 52% ชาวอินเดียในทวีปเอเชีย 83% ญี่ปุ่น 51 - 61% และเกาหลี 75% สำหรับยีน HNA-1c นั้นมีการรายงานการตรวจพบได้น้อย ส่วนใหญ่เป็นรายงานการตรวจพบในชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในทวีปเอเชีย (16%) และชาวเกาหลี (< 1%) และได้สรุปให้เห็นว่าการกระจายตัวของ HNA-1 ในประชากรชาวเอเชียมีความใกล้เคียงกัน และพบว่ามีแตกต่างจากชาวอัฟริกันและชาว Caucasian อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าผลจากการกระจายตัวที่แตกต่างกันของ HNA ในแต่ละเชื้อชาติทำให้ออกาสที่ประชากรแต่ละเชื้อชาติจะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน HNA แต่ละระบบแตกต่างกันไปด้วย

ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 Xia W และคณะ ได้ทำการศึกษาความถี่ของยีน HNA ในประชากรจีนเชื้อสายฮั่นที่อาศัยอยู่ในเมืองกว่างโจว จำนวน 493 ราย โดยใช้วิธี PCR-SSP เพื่อใช้แยกชนิดของยีนตั้งแต่ HNA-1 ถึง HNA-5 แล้วนำผลการวิจัยไปเปรียบเทียบกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ผลการศึกษาพบความถี่ของยีน HNA-1a (0.667) มากเป็นสองเท่าของ HNA-1b (0.333) แต่ไม่พบความถี่ของ HNA-1c (Xia W *et al.* 2011) เช่นเดียวกับความถี่ของยีน HNA-3 ที่พบความถี่ของ HNA-3a มากกว่า HNA-3b ในขณะที่ระบบที่ 2 นั้น พบการแสดงออกของ C-allele มากสุดถึง 69% ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจำนวน HNA-2a-positive neutrophil ในประชากรบางกลุ่ม ส่วน HNA ในระบบที่ 4 นั้นไม่แสดงผลให้เห็นในการแสดงออกของยีน HNA-4bb เลย และในทางตรงกันข้ามก็จะพบการแสดงออกของยีน HNA-5bb ได้ 2.43% ในประชากรกลุ่มนี้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของยีนกับชนผิวขาวสามารถนำมาช่วยในการประเมิน

การตรวจพบ anti-HNA alloimmunization และประเมินการเกิดภาวะ alloimmune neutropenia และ TRALI ในคนจีนได้ด้วย

ตารางที่ 2.3 ความถี่ของแอนติเจน HNA ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ (Moritz E *et al.* 2009)

ประชากร	HNA-1a	HNA-1b	HNA-1c	HNA-1null	HNA-2a	HNA-3a	HNA-4a	HNA-5a
Africans	46 – 66	78 – 84	23 – 31	4	98	NT	NT	88
Chinese	90	52	0	0 - 0.2	99	NT	NT	65
Asian Indians	44	83	16	NT	NT	NT	NT	NT
Japanese	88	51 - 61	0	<0.4	89 - 99	NT	NT	NT
Koreans	78	75	<1	NT	86	NT	99	96
Europeans	52 - 54	87 - 89	5 - 7	0.2 – 0.8	87 - 97	89 - 99	96	96
North Americans	56 - 62	89	5	NT	97	NT	NT	96
Brazilian	100	83	11	NT	97	86 - 95	96	91
Brazilian Indians	83	36	0	NT	NT	NT	100	96

NT: not tested

สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการกระจายตัวของแอนติเจน HNA เพียงหนึ่งฉบับ โดย Changsri K และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ระบบที่ 1, 3, 4 และ 5 ในกลุ่มผู้บริจาคเลือดชาวไทยจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 300 ราย โดยใช้วิธี PCR-SSP สำหรับตรวจหาแอนติเจนระบบที่ 1, 3 และ 4 และใช้วิธี PCR-RFLP สำหรับตรวจหาแอนติเจนระบบที่ 5 ผลการศึกษาพบการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1b ในกลุ่มผู้บริจาคเลือดชาวไทย เท่ากับ 0.53 (273/300) ซึ่งสูงกว่าการกระจายตัวของ HNA-1a ( $p < 0.001$ ) ซึ่งพบเพียง 0.47 (255/300) ในขณะที่ HNA-1c นั้นสามารถตรวจพบได้น้อยมาก (3/300) (Changsri K *et al.* 2014) การศึกษานี้คณะผู้วิจัยชี้ให้เห็นว่าการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1a และ HNA-1b ในประชากรชาวไทยมีความคล้ายคลึงกับประชากรชาวเยอรมัน และชาวตุรกี (Hauck B *et al.* 2011) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) กับความถี่ที่พบในประชากรชาวเอเชีย (Kissel K *et al.* 2000; Han TH and Han KS. 2006) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังสรุปว่าประชากรชาวไทยน่าจะมีความไวต่อการเกิดภาวะ HNA-1b alloimmunization ได้มาก เช่นเดียวกับความถี่ของแอนติเจน HNA-5a ซึ่งพบในชาวไทยได้

คล้ายคลึงกับที่พบในชาวเยอรมันและชาวตุรกี ซึ่งพบว่ามีค่าที่น้อยกว่าในชาวเกาหลีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) ในขณะที่ความถี่ของแอนติเจน HNA-3a ในประชากรไทยนั้นพบได้น้อยกว่า HNA-3b และมีความแตกต่างจากความถี่ที่พบในประชากรเชื้อชาติอื่น ๆ ด้วย (Kissel K *et al.* 2000; Han TH *et al.* 2006; Han TH and Han KS. 2006; Hauck B *et al.* 2011) และในทางตรงข้าม คณะผู้วิจัยได้รายงานให้เห็นถึงความถี่ของแอนติเจน HNA-4a ซึ่งพบในกลุ่มตัวอย่างผู้บริจาคเลือดชาวไทยมีความคล้ายคลึงกับที่พบในชาวเกาหลี (Han TH and Han KS. 2006) และพบได้สูงกว่าในชาวเยอรมันและตุรกีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### บทที่ 3

#### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 3.1 กลุ่มตัวอย่างที่ใช้

3.1.1 ตัวอย่างดีเอ็นเออ้างอิงที่รู้ชนิดของยีน HNA-1 โดยวิธี sequence based typing (SBT) จำนวน 3 ราย ประกอบด้วย

- HNA-1aa, -1c negative จำนวน 1 ราย
- HNA-1bb, -1c negative จำนวน 1 ราย
- HNA-1ac, -1c negative จำนวน 1 ราย

3.1.2 ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคเลือดประจำโรงพยาบาลระยอง จำนวน 230 ราย ที่มีเชื้อชาติไทยอย่างน้อย 2 รุ่น โดยการสัมภาษณ์เชื้อชาติของบรรพบุรุษและประวัติทางด้านสุขภาพ และขออนุญาตทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากถุง buffy coat เพื่อใช้ในการวิจัย

งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ (อ.012/2553)

#### 3.2 ไพรมเมอร์ที่ใช้

ลำดับเบสของไพรมเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบหา HNA-1 จำนวน 8 เส้น ได้มาจากรายงานการวิจัยของ Han TH และคณะ (Han TH *et al.* 2006) ประกอบด้วย ไพรมเมอร์ที่ใช้ทดสอบหาอัลลีลที่จำเพาะกับ HNA-1a, -1b และ -1c จำนวน 6 เส้น และไพรมเมอร์ที่จำเพาะกับ human growth hormone (HGH) ซึ่งใช้เป็น internal control (IC) primer จำนวน 2 เส้น ดังนี้

HNA-1AF	5'CAG TGG TTT CAC AAT GTG AA3'
HNA-1AR	5'ATG GAC TTC TAG CTG CAC3'
HNA-1BF	5'CAA TGG TAC AGC GTG CTT3'
HNA-1BR	5'ACT GTC GTT GAC TGT GTC AG3'
HNA-1CF	5'AAG ATC TCC CAA AGG CTG TG3'
HNA-1CR	5'ACT GTC GTT GAC TGT GTC AT3'
HGH-I	5'TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A3'
HGH-II	5'CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTT TC3'

### 3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดผู้บริจาคด้วยน้ำยา red cell lysis buffer (RCLB) และ nuclear membrane lysis buffer (NMLB) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) นำเลือดผู้บริจาคจากถุง buffy coat ใสลงในหลอดทดลองขนาด 50 มล.
- 2) นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,800 rpm นาน 8 - 10 นาที เพื่อให้ส่วนประกอบของเลือดตกตะกอนแบ่งชั้นตามความถ่วงจำเพาะ
- 3) ใช้ liquipette ดูดพลาสติกิ้ง
- 4) เติม 1X RCLB ประมาณ 1 เท่าของปริมาณเลือดที่เหลือในหลอด จากนั้นเขย่าจนเม็ดเลือดแดงแตกเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ
- 5) นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,800 rpm นาน 5 นาที
- 6) เทสารละลายสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำที่เกิดจากการแตกของเม็ดเลือดแดงทิ้ง เหลือเซลล์ที่กั้นหลอดส่วนที่เป็นก้อนและ/หรือส่วนที่มีสีขาวไว้
- 7) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 4 - 6 จนได้ตะกอนเม็ดเลือดขาว
- 8) เติม NMLB ประมาณ 1 เท่าของเม็ดเลือดขาวที่เหลืออยู่ในหลอดทดลอง เขย่าจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- 9) นำไป incubate ที่ 56 °C ประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะได้สารละลายใส
- 10) เติม chilled 95% alcohol ประมาณ 6 - 8 มล. แล้วเขย่าเบาๆ จนเห็นสายดีเอ็นเอเกาะกันเป็นก้อนสีขาวขุ่น
- 11) ใช้ liquipette เขี่ยชิ้นดีเอ็นเอไปใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล.
- 12) เติม 70% alcohol ประมาณ 1 มล. เขย่าแล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง microcentrifuge แล้วเทส่วนใสทิ้งไป ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง
- 13) เปิดฝาหลอดทดลอง แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จน 70% alcohol แห้งหมด
- 14) เติม 1X TE buffer ประมาณ 1 มล. หรือจนกว่าจะได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 200 ng/ $\mu$ l แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4 °C หรือ -20 °C

3.3.2 การเตรียมส่วนประกอบของการทดสอบ PCR-SSP

- 1) เตรียม TQR ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0 มล. จำนวน 1,885  $\mu$ l/tube ประกอบด้วย

- 10X PCR buffer	352.5	$\mu$ l
- 10 mM dNTPs	250	$\mu$ l
- 1 mM MgCl <sub>2</sub>	7.75	$\mu$ l

- 5% dye 7.5  $\mu$ l
- Steriled distill water 1,467.5  $\mu$ l

2) เตรียม Working primer สำหรับตรวจหา HNA-1a, HNA-1b, HNA-1c ประกอบด้วย

- Internal control primer (forward และ reverse) 0.7  $\mu$ l/เส้น
- Specific allele primer (forward และ reverse) 1.3  $\mu$ l/เส้น
- Steriled distill water 246  $\mu$ l

การตรวจหา ยีน HNA-1 สำหรับดีเอ็นเอ 1 ราย จะใช้ชุดไพรเมอร์ทดสอบทั้งหมด 3 หลอด ประกอบด้วยหลอดสำหรับตรวจหา HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c โดยแต่ละหลอดจะประกอบด้วย specific allele primer 1 คู่ และ internal control primer 1 คู่ ในปริมาตรรวมเท่ากับ 5  $\mu$ l/tube

3.3.3 เตรียม working PCR reaction

ในการทดสอบดีเอ็นเอ 1 ราย จะต้องเตรียม working PCR reaction ดังนี้

TQR (10XPCR buffer, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> )	6.7×4 = 26.8 $\mu$ l/reaction
Taq polymerase (5 unit/ $\mu$ l)	0.3×4 = 1.2 $\mu$ l/reaction
DNA	1×4 = 4 $\mu$ l/reaction

3.3.4 นำ working PCR reaction ที่เตรียมได้ในข้อ 3.3.3 มาหยดลงใน working primer ที่เตรียมไว้เป็นชุดทดสอบ (ดังแสดงในข้อ 3.3.2) หลุมละ 8  $\mu$ l (ปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 13  $\mu$ l/reaction)

3.3.5 ปิดฝาหลอดทดสอบแล้วนำไป spin down ก่อนนำไปใส่ในเครื่อง thermal cycle (Mastervapo.protect, Eppendorf, Germany) เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนโดยวิธี PCR-SSP โดยใช้ อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.1)

**หลักการ PCR-SSP**

ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้สามารถจับกับตำแหน่งของเบสที่จำเพาะต่ออัลลีลของแอนติเจน นั้น ๆ ได้อย่างสมบูรณ์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดแถบสัญญาณให้เห็นได้อย่างชัดเจน (ผลบวก) ในขณะที่ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะจะไม่ปรากฏแถบสัญญาณขึ้นมาให้เห็น (ผลลบ) แถบสัญญาณที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยกระบวนการ electrophoresis ต่อไป

ตารางที่ 3.1 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา HNA-1 โดยวิธี PCR-SSP

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Denaturation	95	5	1
Denaturation	95	1	30
Annealing	60	1	
Extension	72	1	
Extension	72	5	1

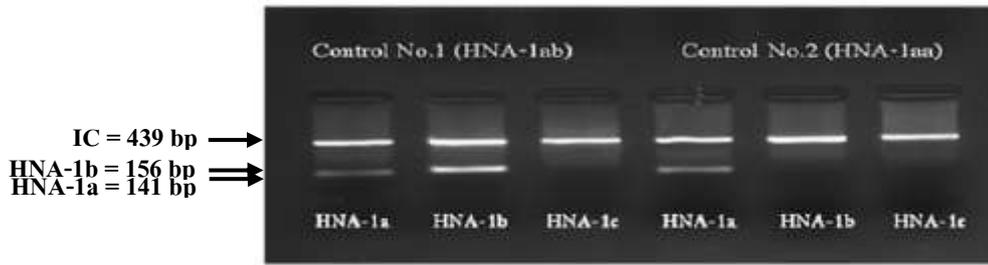
3.3.6 นำผลผลิตที่ได้ (PCR product) มาหาขนาดของดีเอ็นเอบน 2% agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ขนาด 100 โวลต์ (volt) นาน 20 นาที อาศัยการยัดติดระหว่างดีเอ็นเอกับ ethidium bromide เมื่อนำมาถ่ายภาพภายใต้แสง UV จะเห็นการเรืองแสงขึ้นมาบนแผ่นวุ้น แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel document

3.3.7 อ่านและแปลผลการทดลอง

**Positive** พบแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับไพรเมอร์ที่ออกแบบ เรืองแสงบนแผ่นวุ้น

**Negative** ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับที่ออกแบบ

หมายเหตุ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ HNA-1a	=	141 base pair (bp)
	HNA-1b	=	156 bp
	HNA-1c	=	191 bp
	Internal control (IC)	=	439 bp



รูปที่ 3.1 การแปลผลการตรวจหา HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่รู้ชนิดจีโนทัยป์ของ HNA-1

จากรูป ตัวอย่างควบคุมหมายเลข 1 (control No.1) ตรวจพบทั้งแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ HNA-1a และ -1b และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ HNA-1c แปลผลจีโนทัยป์เป็น HNA-1ab, 1c negative ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมหมายเลข 2 (control No.2) ตรวจพบเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ HNA-1a (141 bp) แปลผลจีโนทัยป์เป็น HNA-1aa, 1c negative

### 3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

3.4.1 กำหนดหาเปอร์เซ็นต์ความถี่ของจีโนทัยป์ (% genotype frequency; %GF) และเปอร์เซ็นต์ความถี่ของอัลลีล (%allele frequency; %AF) โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ genotype frequency} = \frac{\text{จำนวน genotype ที่ตรวจพบ}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100$$

$$\% \text{ allele frequency} = \frac{\text{จำนวนของ allele ที่ตรวจพบ}}{2 \times \text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}} \times 100$$

3.4.2 Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) เพื่อดูความสมดุลของกลุ่มตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลองตามกฎของ Hardy-Weinberg Equilibrium โดยใช้โปรแกรม Excel

3.4.3 เปรียบเทียบความแตกต่างของความถี่ HNA-1a, -1b และ -1c ที่พบในชาวไทยกับเชื้อชาติอื่น ๆ โดยการคำนวณค่าไคร้สแควร์ (chi-square;  $\chi^2$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

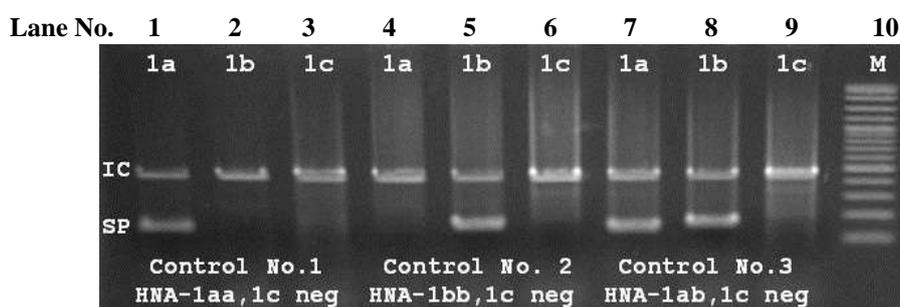
3.4.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree analysis) โดยการคำนวณค่า Nei's genetic distance ด้วยโปรแกรม phylip version 3.68 และสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม Splits Tree

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในตัวอย่างควบคุมโดยวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้น

คณะผู้วิจัยได้ปรับปรุงวิธี PCR-SSP ของ Han TH และคณะ เพื่อใช้ในการตรวจหาฮีน HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุม (control DNA) ที่ทราบชนิดของ แอนติเจน HNA-1 จำนวน 3 ราย มาทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Han TH *et al.* 2006) ผลการตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 439 base pair (bp) ซึ่งจำเพาะต่อ human growth hormone (HGH) สำหรับเป็นแถบควบคุมภายใน (internal control; IC) ของทุกหลอดทดลอง และตรวจพบ แถบดีเอ็นเอขนาด 141, 156 และ 191 bp ที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ตามลำดับ ในแต่ละหลอดทดลองซึ่งให้ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ถูกต้องและตรงกับผลที่ได้จากการ ตรวจด้วยวิธี sequence based typing (SBT) (รูปที่ 4.1)



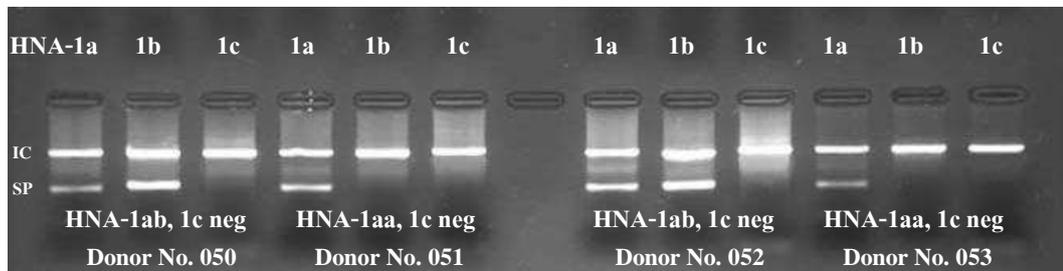
รูปที่ 4.1 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ของตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมด้วยวิธี PCR-SSP

จากรูป **แถวที่ 10** แสดงแถบของ molecular weight marker (M) โดยใช้ 100 bp-DNA ladder marker (VC 100 bp DNA Ladder, Vivantis, Malaysia) ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ของดีเอ็นเอควบคุม จำนวน 3 ราย พบแถบดีเอ็นเอขนาด 439 bp ที่ใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control; IC) ของทุกหลอดทดลอง **แถวที่ 1 ถึง 3** แสดงผลการตรวจของตัวอย่างควบคุม หมายเลข 1 ซึ่งพบแถบของ allele-specific primer (SP) ขนาด 141 bp เฉพาะแถวที่ 1 ซึ่งเป็นหลอดทดลองที่มีไพรเมอร์สำหรับ HNA -1a อยู่ จึงแปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1aa, 1c negative **แถวที่ 4 ถึง 6** แสดงผลการตรวจของตัวอย่างควบคุม หมายเลข 2 ซึ่งพบแถบของ SP ขนาด 156 bp เฉพาะแถวที่ 5 ซึ่งเป็นหลอดทดลองที่มีไพรเมอร์สำหรับ HNA -1b จึงแปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1bb, 1c negative **แถวที่ 7 ถึง 9** แสดงผลการตรวจของตัวอย่างควบคุม หมายเลข 3 ซึ่งพบแถบของ SP ขนาด 141 และ 156 bp ในแถวที่ 7 และ 8 ซึ่งเป็นหลอดทดลองที่มีไพรเมอร์ สำหรับ HNA -1a และ -1b ตามลำดับ จึงแปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1ab, 1c negative

#### 4.2 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในตัวอย่างดีเอ็นเอของประชากรเชื้อชาติไทยแท้

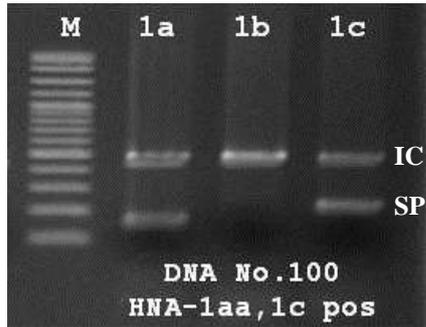
คณะผู้วิจัยได้นำวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้นไปใช้ในการตรวจหา HNA-1 genotype ของตัวอย่างดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดประจำที่มีเชื้อชาติไทยแท้ของโรงพยาบาลระยอง จำนวน 230 ราย (รูปที่ 4.2 และ 4.3) เมื่อนำผลการตรวจหา HNA-1 genotype มาตรวจสอบความสมดุลของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยตามกฎของ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้อยู่ในภาวะสมดุลของ Hardy-Weinberg ( $p$ -value = 0.885) (ตารางที่ 4.1) กลุ่มตัวอย่างที่ใช้มีขนาดและการแสดงลักษณะฟีโนทัยป์ (phenotype) ที่เหมาะสม (goodness of fit)

ผลการทดลองพบการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ในประชากรไทยแท้ จำนวน 230 ราย คิดเป็นร้อยละของการแสดงออกทางฟีโนทัยป์แบบ HNA-1aa เท่ากับ 55.21 ฟีโนทัยป์แบบ HNA-1ab เท่ากับ 33.91 ฟีโนทัยป์แบบ HNA-1bb เท่ากับ 10.43 และฟีโนทัยป์แบบ HNA-1null เท่ากับ 0.43 (ตารางที่ 4.1) จากลักษณะการแสดงออกข้างต้น ส่งผลให้พบความถี่ของอัลลีล HNA-1a ในประชากรชาวไทยแท้มากกว่าสองเท่าของ HNA-1b โดยพบความถี่ของ HNA-1a เท่ากับ 0.722 และ HNA-1b เท่ากับ 0.274 (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่ความถี่ของ HNA-1c นั้นพบได้น้อยมาก (ความถี่ เท่ากับ 0.009)



รูปที่ 4.2 ผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในดีเอ็นเอผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้โดยวิธี PCR-SSP

จากรูป แสดงให้เห็นผลการตรวจหา HNA-1 genotype ในดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลระยอง จำนวน 4 ราย ผู้บริจาคหมายเลข 050 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอทั้งในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a และ -1b มี HNA-1 genotype เป็น HNA-1ab, 1c negative ผู้บริจาคหมายเลข 051 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a แปลผลเป็น HNA-1aa, 1c negative ผู้บริจาคหมายเลข 052 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอทั้งในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a และ -1b แปลผลเป็น HNA-1ab, 1c negative และ ผู้บริจาคหมายเลข 053 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a แปลผลเป็น HNA-1aa, 1c negative



รูปที่ 4.3 ผลการตรวจหา HNA-1c ในดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้

จากรูป ดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้หมายเลข 100 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอในหลอดที่มีไพรเมอร์ -1a และ -1c แปลผล HNA-1 genotype เป็น HNA-1aa, 1c positive

ตารางที่ 4.1 การทดสอบ Hardy–Weinberg Equilibrium ของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ จำนวน 230 ราย

Genotypes	Number (%)	Observed frequency	Expected frequency	H-WE analysis
HNA-1aa	127 (55.21)	0.552	0.523	$\chi^2 = 0.021$ $p\text{-value} = 0.885$
HNA-1ab	78 (33.91)	0.339	0.397	
HNA-1bb	24 (10.43)	0.104	0.075	
HNA-1null	1 (0.43)	0.004		

ตารางที่ 4.2 ความถี่อัลลีลของ HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดชาวไทยแท้

HNA-1 allele	Gene frequency (%)
HNA-1a	0.722
HNA-1b	0.274
HNA-1c	0.009
HNA-1null	0.004

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

การตรวจหาแอนติเจนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลของมนุษย์ (human neutrophil antigen: HNA) สามารถตรวจได้ทั้งทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) และทางโมเลกุล (molecular) แต่การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยานั้นมีข้อจำกัดอยู่ที่แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนของ neutrophil นั้นมีอยู่น้อย และปริมาณนิวโทรฟิลของผู้ป่วยที่ใช้ในการตรวจในภาชนะนั้นก็จะมีจำนวนน้อย อีกทั้งการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยานั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนทัยป์ (genotype) ที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) ออกจากชนิดที่เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ ดังนั้นการตรวจหาฮีนของนิวโทรฟิลโดยวิธีทางโมเลกุลจึงช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตาม วิธีการตรวจทางโมเลกุลนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ดังที่ได้กล่าวรายละเอียดไว้ในบทที่ 2 เช่น วิธี PCR-SBT และ PCR-SSP เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน และถึงแม้ว่าวิธี PCR-SBT จะมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือที่สุด แต่วิธีนี้ก็ยังต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ต้องอาศัยผู้ทดลองที่มีความชำนาญ และมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธี PCR-SSP เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก ทำให้สามารถตรวจหาฮีนของแอนติเจนของเม็ดเลือดขาว neutrophil ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งการตรวจโดยวิธีนี้ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมต่อความคุ้มค่าในการตรวจแต่ละครั้ง ทำให้สามารถทำการตรวจได้ทันทีถึงแม้ว่าจะมีจำนวนตัวอย่างเพียงรายเดียวก็ตาม

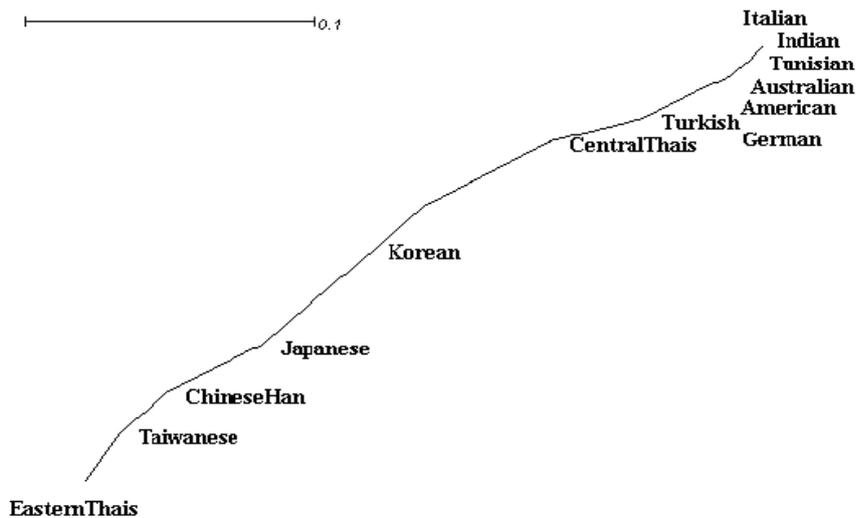
คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจหา HNA-1 ตามวิธีของ Han TH และคณะโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบชนิด HNA-1 (Han TH *et al.* 2006) แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะสามารถนำมาใช้ตรวจหาได้ทั้ง HNA-1aa และ -1ab แต่พบว่าแถบของผลผลิตที่เกิดขึ้น (PCR product) ยังไม่คมชัดเท่าที่ควร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง เพื่อให้สามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในห้องปฏิบัติการอย่างเหมาะสมและให้ผลการตรวจอย่างชัดเจน โดยการปรับเพิ่มความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  จาก 1.5 เป็น 2.5 mM และเพิ่มความเข้มข้นของ *Taq* polymerase จาก 1.5 เป็น 2.0 unit/reaction และใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ประมาณ 200 ng/reaction จึงทำให้เห็นแถบของฮีนที่ปรากฏได้ชัดเจนขึ้น การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำทดลองระหว่างวิธีของ Han TH และคณะ และวิธีที่ปรับปรุงขึ้นดังแสดงในตารางที่ 5.1 นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ลดเวลาในขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา PCR ในช่วงแรกจาก 95 °C นาน 30 นาที ให้เหลือเพียง 5 นาที ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจหาฮีน HNA-1 โดยวิธีที่ปรับปรุงขึ้นมานี้รวดเร็วกว่าการทดลองตามวิธีของ Han TH และคณะ

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ระหว่างวิธีของ Han TH และคณะ (Han TH *et al.* 2006) และวิธีที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่

ความเข้มข้นสุดท้าย	วิธีของ Han TH และคณะ	วิธีที่ปรับปรุงขึ้น
Internal control primer ( $\mu\text{M}/\text{reaction}$ )	0.1	0.1
Allele-specific primer ( $\mu\text{M}/\text{reaction}$ )	0.4	0.4
MgCl <sub>2</sub> (mM/reaction)	1.5	2.5
dNTPs (mM/reaction)	0.6	0.6
Taq polymerase (unit/reaction)	1.5	2.0

ผลจากการนำวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้นมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจน HNA-1 ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดประจำที่มีเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงของไทย (Eastern Thais) จำนวน 230 ราย ซึ่งมีเชื้อชาติไทยอย่างน้อย 2 รุ่น และไม่มีความสัมพันธ์กันทางเครือญาติ พบว่า การกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 เป็นแบบ homozygous HNA-1a (HNA-1aa) มากที่สุด รองลงมาคือ HNA-1ab และ HNA-1bb ตามลำดับ นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ยังพบการกระจายตัวของจีโนทัยป์ HNA-1null ร้อยละ 0.004 ของประชากรที่มีเชื้อชาติไทยแท้ด้วย เมื่อคำนวณหาความถี่ของอัลลีล (allele frequency) พบความถี่ของ HNA-1a เท่ากับ 0.722 ซึ่งมากเป็น 2.6 เท่าของ HNA-1b (0.274) สำหรับแอนติเจน HNA-1c นั้น พบเพียง 0.009 ส่วนใหญ่จะไม่มี การแสดงออกของแอนติเจน HNA-1c (HNA-1c negative) (0.991) เมื่อเปรียบเทียบค่าความถี่ของ การกระจายตัวของ HNA-1 ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่างเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงของไทย (Eastern Thais) ซึ่งเป็นผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลระยองกับความถี่ที่พบใน ชาวไทย ซึ่งเป็นผู้บริจาคเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย หรือที่เรียกว่า ชาวไทย ภาคกลาง (Central Thais) ซึ่งส่วนใหญ่มีเชื้อชาติผสมระหว่างชาวไทยกับชาวจีน และชาวไทยกับ เชื้อชาติอื่น ๆ (Romphruk AV *et al.* 1999; Kupatawintu P *et al.* 2010; Changsri K *et al.* 2014) ผลการวิเคราะห์พบว่าการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ของผู้บริจาคเลือดที่มีเชื้อชาติไทยแท้ที่ อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงของไทยมีความแตกต่างกับความถี่ที่พบในประชากรชาวไทยภาคกลาง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\text{-value} < 0.05$ ) เช่นเดียวกับที่พบความแตกต่างในชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ ในแถบภูมิภาคเอเชีย (Indians) และชาว Caucasian (Turkish, Australian, American, German, และ Italian) (Abid S *et al.* 2001; Flesch BK *et al.* 2002; Hauck B *et al.* 2011; Xia W *et al.* 2011) ซึ่งพบ ความถี่ของแอนติเจน HNA-1b มากกว่า HNA-1a และพบข้อมูลที่ตรงกันข้ามกับรายงานวิจัยของ Changsri K และคณะ โดยในงานวิจัยนี้พบว่าการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ของ

ผู้บริจาคเลือดที่มีเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกของไทยไม่มีความแตกต่างกับประชากรในทวีปเอเชีย (Chinese Han, Taiwanese, Korean และ Japanese) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value >0.05) ส่วนใหญ่พบความถี่ของ HNA-1a มากกว่า HNA-1b (รูปที่ 5.1) (ตารางที่ 5.2) (Han TH *et al.* 2006; Tsuno H *et al.* 2011; Xia W *et al.* 2011) รูปแบบการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ในประชากรชาวไทยแท้ที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Kupatawintu P และคณะ และงานวิจัย Romphruk AV และคณะ เกี่ยวกับการกระจายตัวของแอนติเจน HLA ของประชากรไทยที่มีเชื้อสายต่าง ๆ รวมทั้งชาวไทยที่อาศัยอยู่ในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีความคล้ายคลึงกับประชากรชาวจีนที่อาศัยอยู่ทางใต้ของประเทศ (Romphruk AV *et al.* 1999; Kupatawintu P *et al.* 2010) ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างชาวไทยที่ใช้ในการศึกษาการกระจายตัว HNA จากทั้งสองภูมิภาค และความแตกต่างของแอนติเจน HNA ในประชากรชาวไทยแต่ละเชื้อชาติกับประชากรเชื้อชาติอื่น ๆ



**รูปที่ 5.1** Neighbor-joining tree แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ของประชากรเชื้อชาติไทยกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ

Phylogenetic tree ของผู้บริจาคเลือดเชื้อชาติไทยจาก 2 ภูมิภาค ได้แก่ ชาวไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออก (Eastern Thais) เปรียบเทียบกับชาวไทยที่มีเชื้อชาติผสมที่อยู่ในภาคกลาง (Central Thais) และประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ โดยการคำนวณค่า Nei's genetic distance ผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่าการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกมีความใกล้ชิดกับประชากรชาวเอเชีย (Chinese Han, Taiwanese, Korean และ Japanese) และมีความแตกต่างจากชาวไทยที่มีเชื้อชาติผสมที่อาศัยอยู่ในภาคกลาง และชาว Caucasians (Indian, Turkish, Australian, Tunisian, American, German และ Italian) อย่างชัดเจน

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังตรวจพบ HNA-1c (HNA-1c positive) ในกลุ่มผู้บริจาคที่มีเชื้อชาติไทยแท้ (เท่ากับ 0.009) ใกล้เคียงกับข้อมูลที่ตรวจพบในผู้บริจาคชาวไทยที่มีเชื้อชาติผสม (เท่ากับ 0.005) ในขณะที่ในประชากรชาว Caucasians นั้นพบได้ประมาณ 0.025 – 0.030 (Bux J. 2001) ในงานวิจัยนี้พบการแสดงออกของ HNA-1c ในกลุ่มตัวอย่างชาวไทยแท้ที่มีจีโนทัยป์แบบ HNA-1aa ซึ่งตรงกันข้ามกับรายงานการศึกษาในประชากรชาวอาเจนตินเนียน (Argentinean) ที่ชี้ให้เห็นว่าไม่มีโอกาสตรวจพบ HNA-1c ในกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนทัยป์ HNA-1aa (de La Vega Elena CD *et al.* 2008) อย่างไรก็ตาม เคยมีรายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่า การแสดงออกร่วมกันของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c นั้นสามารถพบได้ในบุคคลที่มียีน *Fc $\gamma$ RIIB* ทั้ง 3 อัลลิล (Koene HR *et al.* 1998; Steffensen R *et al.* 1999)

การตรวจพบการแสดงออกของแอนติเจนแบบ HNA-1null ในกลุ่มตัวอย่างชาวไทยแท้ (0.004) ในครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่ามีผู้บริจาคชาวไทยที่มีโอกาสที่จะถูกกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสร้าง HNA-1 alloantibodies ได้สูง ดังนั้น จึงควรติดตามนำผู้บริจาคเลือดเหล่านี้มาทำการศึกษาจนถึงระดับครอบครัวเพื่อหาแนวทางในการป้องกันการสร้าง HNA-1 alloantibody ต่อไป

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ สามารถนำไปใช้ในการพยากรณ์โอกาสในการเกิดภาวะของโรคในกลุ่มประชากรที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ดังนั้น จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-1 (anti-HNA-1) เป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะ auto/alloimmune neutropenia และ TRALI ทั้งในประชากรกลุ่ม Asians และ Caucasian (Lucas G *et al.* 2000; Bruin M *et al.* 2005; Curtis BR *et al.* 2005; Marin L *et al.* 2005; Han TH *et al.* 2006; Wang LY *et al.* 2009) ซึ่งมีการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1a และ -1b ที่แตกต่างกัน จากรายงานวิจัยของ Han TH และคณะ และรายงานของ Bux J ชี้ให้เห็นว่า anti-HNA-1a เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดภาวะ alloimmune neonatal neutropenia ในกลุ่มคน Caucasian ซึ่งมีการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1a ต่ำกว่า HNA-1b แต่ยังมีรายงานการตรวจพบน้อย สำหรับภาวะ TRALI นั้นพบที่มีความสัมพันธ์กับ HNA-1 น้อยมาก (Bux J. 2001; Han TH *et al.* 2006) เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Xia W และคณะ ที่เคยรายงานว่าในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการตรวจพบ anti-HNA-1a ในประชากรชาวจีน (Xia W *et al.* 2011) ข้อมูลดังกล่าวจึงช่วยสนับสนุนผลการวิจัยในครั้งนี้ได้ว่าแนวโน้มของการเกิดภาวะ TRALI และ neutropenia ในประชากรชาวไทยแท้ น่าจะมีสาเหตุจาก anti-HNA-1a เช่นเดียวกับในชาวจีน และประชากรในกลุ่ม Asians (Chinese Han, Taiwanese, Korean และ Japanese) ซึ่งมีการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ใกล้เคียงกัน แต่มีโอกาสดูตรวจพบได้น้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัด

ในเรื่องของการวินิจฉัยภาวะของโรคซึ่งมีความซับซ้อนและมักเกิดร่วมกับสาเหตุอื่น ๆ (Fung YL *et al.* 2003; Capsoni F *et al.* 2005; Silliman CC *et al.* 2009)



ตารางที่ 5.2 ความถี่ของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ในประชากรเชื้อชาติไทยเทียบกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ

	Eastern Thais (n=230)	Central Thais (n=300)	Chinese Han (n=493)	Taiwanese (n=128)	Korean (n=200)	Japanese (n=523)	Indian (n=92)	Turkish (n=118)	Australian (n=200)	Tunisian (n=191)	American (n=90)	German (n=260)	Italian (n=200)
<b>HNA-1a</b>	0.722	0.470	0.667	0.680	0.520	0.623	0.300	0.420	0.365	0.311	0.367	0.373	0.282
<b>HNA-1b</b>	0.274	0.530	0.333	0.309	0.480	0.377	0.700	0.564	0.635	0.668	0.633	0.627	0.718
<b>HNA-1c</b>	0.009	0.005	0.000	0.000	NT	0.000	0.000	0.030	0.030	0.000	0.000	0.025	NT
<b>HNA-1null</b>	0.004												
<b>Reference</b>	This study	(Changsri K <i>et al.</i> 2014)	(Xia W <i>et al.</i> 2011)	(Tsuno H <i>et al.</i> 2011)	(Han TH <i>et al.</i> 2006)	(Tsuno H <i>et al.</i> 2011)	(Xia W <i>et al.</i> 2011)	(Hauck B <i>et al.</i> 2011)	(Xia W <i>et al.</i> 2011)	(Abid S <i>et al.</i> 2001)	(Xia W <i>et al.</i> 2011)	(Flesch BK <i>et al.</i> 2002; Xia W <i>et al.</i> 2011)	(Xia W <i>et al.</i> 2011)

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ไม่เพียงแต่จะมีความสำคัญต่อการคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วยที่มีภาวะ neutropenia allo/autoimmunization, transfusion related acute lung injury (TRALI), febrile transfusion reaction และ granulocyte refractoriness แต่ยังรวมไปถึงการมีประโยชน์ในการบริหารจัดการงานบริการโลหิตของหน่วยงาน เช่น ใช้ในการจัดทำฐานข้อมูลของผู้บริจาคเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกเซลล์สำหรับใช้ในการตรวจคัดกรองหรือยืนยันภาวะของโรค การพยากรณ์โอกาสการเกิดภาวะของโรคในประชากรของแต่ละประเทศ แต่ละเชื้อชาติ และใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาทางด้านมานุษยวิทยา เป็นต้น ปัจจุบัน การศึกษาความสำคัญของแอนติเจนและแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดขาว neutrophil ยังมีน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากข้อจำกัดในการตรวจ ทั้งในด้านความชำนาญของบุคลากร งบประมาณที่ใช้ และต้นทุนการผลิตและจัดซื้อชุดน้ำยาสำเร็จที่มีราคาสูง ในประเทศไทยยังมีรายงานการวิจัยออกมาเพียง 1 ฉบับ โดยใช้กลุ่มตัวอย่างของผู้บริจาคเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งอาศัยอยู่ในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล ซึ่งเคยถูกรายงานเป็นตัวแทนของประชากรไทยภาคกลาง (Rompasuk AV *et al.* 1999; Kupatawintu P *et al.* 2010; Changsri K *et al.* 2014) ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีทั้งประชากรที่มีเชื้อชาติไทยแท้ เชื้อชาติไทย-จีน และเชื้อชาติไทยผสมกับเชื้อชาติอื่น ๆ งานวิจัยนี้จึงได้ปรับปรุงชุดน้ำยาสำหรับตรวจหาฮีน HNA-1 โดยวิธี PCR-SSP เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาชนิดของแอนติเจนบน neutrophil ของผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลระยอง และทำการศึกษาถึงระดับเชื้อชาติโดยคัดเลือกผู้บริจาคที่มีเชื้อชาติไทยอย่างน้อย 2 รุ่น เพื่อจัดทำฐานข้อมูลของผู้บริจาคเลือดเพื่อพยากรณ์โอกาสในการเกิดภาวะของโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในกลุ่มผู้ป่วยของโรงพยาบาล รวมถึงเพื่อนำไปพัฒนาใช้ในการตรวจหาแอนติเจน HNA ระบบอื่น ๆ และเป็นฐานข้อมูลของการศึกษาทางด้านมานุษยวิทยาของประชากรไทย คณะผู้วิจัยได้นำผลการทดลองไปคำนวณหาค่าความถี่และเปรียบเทียบความถี่ที่พบในประชากรเชื้อชาติไทยแท้กับประชากรเชื้อชาติไทยที่อาศัยอยู่ในภาคกลางของไทยและประชากรเชื้อชาติอื่น ๆ เนื่องจากการกระจายตัวของแอนติเจนในแต่ละเชื้อชาตินั้นมีความแตกต่างกัน (Kissel K *et al.* 2000; Abid S *et al.* 2001; Yan L *et al.* 2005; Cardone JD *et al.* 2006; Bux J. 2008; Moritz E *et al.* 2009; Norcia AM *et al.* 2009; Changsri K *et al.* 2014) และจะนำไปสู่โอกาสของการเกิดโรคหรือภาวะต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน

## 6.1 สรุปผลการวิจัย

ชุดน้ำยาสำหรับตรวจหาแอนติเจน HNA-1 โดยวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้นทำให้สามารถตรวจหาแอนติเจน HNA-1 ได้อย่างถูกต้อง ชัดเจน และรวดเร็ว สามารถทำการตรวจให้แล้วเสร็จภายในเวลา 3 ชั่วโมงหลังการสกัดดีเอ็นเอ ประเมินการค่าใช้จ่ายในการตรวจหาแอนติเจน 1 ระบบต่อจำนวนตัวอย่าง 1 ราย คิดเป็นเงินประมาณ 400 บาท

จากการทดสอบในตัวอย่างดีเอ็นเอของประชากรไทย ทั้ง 230 ราย พบความถี่ของการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1a มากกว่าสองเท่าของการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1b ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการกระจายตัวที่พบในประชากรชาวเอเชียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value  $>0.05$ ) แต่มีความแตกต่างจากการกระจายตัวที่พบในประชากรชาวไทยภาคกลางและประชากรในกลุ่ม Caucasian ซึ่งพบความถี่ของแอนติเจน HNA-1b มากกว่า HNA-1a อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value  $<0.05$ ) ดังนั้น แนวโน้มของการเกิดภาวะ neutropenia และ TRALI ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้ที่เกิดจากแอนติบอดีต่อ HNA-1 จึงน่าจะมีความคล้ายคลึงกับที่พบในประชากรจีนเชื้อสายฮั่น และชาวเอเชีย (Bux J. 2001; Han TH *et al.* 2006; Xia W *et al.* 2011) แม้ว่าจะมีรายงานการตรวจพบน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากความซับซ้อนของโรคและข้อจำกัดในการวินิจฉัยโรค แต่ภาวะเหล่านั้นอาจมีความรุนแรงจนถึงขั้นทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตอย่างเฉียบพลันภายหลังการรับส่วนประกอบของเลือดที่มีแอนติบอดี HNA ปนอยู่ ดังนั้น จึงควรมีการติดตามและประเมินผลการตรวจหาแอนติบอดีดังกล่าวในส่วนประกอบของเลือดของผู้บริจาคเลือดชาวไทยก่อนที่จะนำไปให้แก่ผู้ป่วย รวมถึงการคัดเลือกส่วนประกอบของเลือดที่มีแอนติเจน neutrophil ที่เข้ากันได้ให้แก่ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงมีความจำเป็นที่ใช้ส่วนประกอบของเลือดที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดภาวะไม่พึงประสงค์ภายหลังการรับเลือดต่อไป

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

### 6.2.1 การนำผลที่ได้จากการวิจัยไปใช้

1) การนำวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้นไปใช้ ในงานวิจัยนี้พบว่า วิธีที่ปรับปรุงขึ้นให้ผลการตรวจหาแอนติเจน HNA ระบบที่ 1 (HNA-1) ได้อย่างชัดเจน ถูกต้อง และรวดเร็ว ดังนั้น จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการนำไปปรับปรุงเพื่อให้สามารถใช้สำหรับตรวจหาแอนติเจนในระบบที่ 2 ถึง 5 ที่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในประชากรชาวไทยแท้ รวมถึงนำไปใช้ในการปฏิบัติงานของห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดแห่งอื่น ๆ เพื่อจัดทำฐานข้อมูลผู้บริจาคและคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วยในเวลาเร่งด่วน เพราะใช้เวลาทั้งหมดในกระบวนการตรวจไม่เกิน 4 ชั่วโมง อีกทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าชุดน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศ และสามารถทำการตรวจ

ได้ทันทีแม้จะมีจำนวนตัวอย่างที่ต้องการตรวจเพียงรายเดียวโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจ ตัวอย่างควบคุมควบคุมกระบวนการทำงาน อย่างไรก็ตาม ห้องปฏิบัติการอื่น ๆ ที่ต้องการนำวิธีนี้ไปใช้ ควรตรวจสอบความถูกต้องของผลการตรวจอีกครั้งเมื่อมีการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่แตกต่างจากที่ใช้ในการวิจัยนี้

2) การจัดทำฐานข้อมูลของผู้บริจาคและการจัดทำฐานข้อมูลทางมานุษยวิทยา จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงของไทยมีความแตกต่างจากผลการศึกษาในกลุ่มผู้บริจาคเลือดชาวไทยที่อาศัยอยู่ในภาคกลางและชาว Caucasian อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งขัดแย้งกับรายงานการศึกษารูปแบบการกระจายตัวของแอนติเจนในระบบ human leukocyte antigen (HLA) และ human platelet antigen (HPA) ของประชากรไทยที่มีเชื้อชาติต่าง ๆ ในแต่ละภูมิภาคที่มีความคล้ายคลึงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาหาข้อมูลของแอนติเจน HNA ในระบบที่เหลือ ได้แก่ ระบบที่ 2 ถึง 5 ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้เพิ่มเติมเพื่อยืนยันความแตกต่างของการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจากทั้งสองภูมิภาค รวมถึงการศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ในประชากรชาวไทยที่มีเชื้อชาติอื่น ๆ ร่วมด้วย เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านมานุษยวิทยา และการจัดทำฐานข้อมูลของผู้บริจาคของโรงพยาบาลเพื่อคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมให้กับผู้ป่วย และคัดเลือกเซลล์มาใช้ในการทดสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไป

## 6.2.2 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1) การนำวิธี PCR-SSP ที่ปรับปรุงขึ้นนี้ไปใช้ในการตรวจหาแอนติเจน HNA-2 ถึง HNA-5 โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของแถบดีเอ็นเอในแต่ละระบบด้วยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะให้มีความยาวแตกต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจะสามารถนำวิธีที่ปรับปรุงขึ้นนี้ไปพัฒนาชุดน้ำยาขึ้นมาใหม่ในรูปแบบของเทคนิค multiplex-PCR เพื่อให้สามารถตรวจหาแอนติเจนในระบบที่เหลืออยู่ได้พร้อม ๆ กัน ภายในเวลาและกระบวนการเดียวกัน

2) การทำนายอุบัติการณ์และการเฝ้าระวังการเกิดภาวะของโรคในประชากรเชื้อชาติไทย จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ากลุ่มผู้บริจาคเลือดเชื้อชาติไทยแท้มีการกระจายของแอนติเจน HNA-1 คล้ายคลึงกับที่พบในชาวจีนเชื้อสายฮั่น และชาวเอเชีย ดังนั้น จึงมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ neutropenia และ TRALI จากแอนติบอดีต่อ HNA-1a เช่นเดียวกับประชากรในกลุ่มดังกล่าว แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานยืนยันสาเหตุของการก่อให้เกิดภาวะดังกล่าวอันเนื่องมาจากแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HNA-1a ในประชากรไทย ดังนั้น เพื่อประโยชน์ของการตรวจวินิจฉัย และการพัฒนา

กระบวนการตรวจคัดกรองเลือดผู้บริจาคในประเทศไทย จึงควรมีการศึกษาอุปกรณ์และสาเหตุของการเกิดภาวะดังกล่าว รวมถึงพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีต่อ HNA ระบบอื่น ๆ ที่อาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานในประชากรชาวจีนเชื้อสายฮั่น และชาวเอเชียร่วมด้วย

## บรรณานุกรม

- Abid S, Zili M, Bouzid L, *et al.* (2001) "Gene frequencies of human neutrophil antigens in the Tunisian blood donors and Berbers" *Tissue Antigens*. 58(2): page 90-2.
- Abou-Chaker K, Meyer O and Salama A. (2009) "Rapid typing of the human neutrophil antigen 1a by the particle gel agglutination assay" *Tissue Antigens*. 73(3): page 242-4.
- Bruin M, Dassen A, Pajkrt D, Buddelmeyer L, Kuijpers T and de Haas M. (2005) "Primary autoimmune neutropenia in children: a study of neutrophil antibodies and clinical course" *Vox Sang*. 88(1): page 52-9.
- Bux J. (1996) "Autoimmune neutropenia" *Dtsch Med Wochenschr*. 121(9): page 287.
- Bux J. (1996) "Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens" *Transfus Med Rev*. 10(3): page 222-32.
- Bux J. (2001) "Granulocyte immunology" *Wien Klin Wochenschr*. 113(20-21): page 799-805.
- Bux J. (2001) "Molecular nature of granulocyte antigens" *Transfus Clin Biol*. 8(3): page 242-7.
- Bux J. (2002) "Molecular nature of antigens implicated in immune neutropenias" *Int J Hematol*. 76(Suppl 1): page 399-403.
- Bux J. (2008) "Human neutrophil alloantigens" *Vox Sang*. 94(4): page 277-85.
- Bux J, Behrens G, Jaeger G and Welte K. (1998) "Diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: analysis of 240 cases" *Blood*. 91(1): page 181-6.
- Bux J and Chapman J. (1997) "Report on the second international granulocyte serology workshop" *Transfusion*. 37(9): page 977-83.
- Bux J, Kober B, Kiefel V and Mueller-Eckhardt C. (1993) "Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens" *Transfus Med*. 3(2): page 157-62.
- Bux J, Stein EL, Santoso S and Mueller-Eckhardt C. (1995) "NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers" *Transfusion*. 35(1): page 54-7.
- Capsoni F, Sarzi-Puttini P and Zanella A. (2005) "Primary and secondary autoimmune neutropenia" *Arthritis Res Ther*. 7(5): page 208-14.

- Cardone JD, Bordin JO, Chiba AK, Norcia AM and Vieira-Filho JP. (2006) "Gene frequencies of the HNA-4a and -5a neutrophil antigens in Brazilian persons and a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for HNA-5a genotyping" *Transfusion*. 46(9): page 1515-20.
- Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V and Stroncek D. (2003) "Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy" *Transfusion*. 43(3): page 357-63.
- Changsri K, Tobunluepop P, Songthammawat D, Apornsuwan T, Kaset C and Nathalang O. (2014) "Human neutrophil alloantigen genotype frequencies in Thai blood donors" *Blood Transfus*. 12(Suppl 1): page 1-6.
- Chu CC, Lee HL, Chu TW and Lin M. (2001) "The use of genotyping to predict the phenotypes of human platelet antigens 1 through 5 and of neutrophil antigens in Taiwan" *Transfusion*. 41(12): page 1553-8.
- Chu HT, Lin H, Tsao TT, *et al.* (2013) "Genotyping of human neutrophil antigens (HNA) from whole genome sequencing data" *BMC Med Genomics*. 6(1): page 31.
- Costa E, Antunes MB, Faria S, *et al.* (2004) "Determination of neutrophil Fcγ receptor IIIb antigens (HNA-1a, HNA-1b and HNA-1c) by fluorescence-primed allele-specific polymerase chain reaction" *Clin Lab Haematol*. 26(5): page 319-21.
- Curtis BR, Reno C and Aster RH. (2005) "Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (SH): a report of five cases" *Transfusion*. 45(8): page 1308-13.
- Davoren A, Curtis BR, Shulman IA, *et al.* (2003) "TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) alloantibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities" *Transfusion*. 43(5): page 641-5.
- Davoren A, Saving K, McFarland JG, Aster RH and Curtis BR. (2004) "Neonatal neutropenia and bacterial sepsis associated with placental transfer of maternal neutrophil-specific autoantibodies" *Transfusion*. 44(7): page 1041-6.
- de Haas M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D and von dem Borne AE. (1995) "Neutrophil Fcγ receptor IIIb deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families" *Blood*. 86(6): page 2403-13.

- de La Vega Elena CD, Nogues N, Fernandez Montoya A, Oyonarte S, Solis E and Muniz-Diaz E. (2008) "HNA-1a, HNA-1b and HNA-1c gene frequencies in Argentineans" *Tissue Antigens*. 71(5): page 475-7.
- Decary F, Verheugt FW, van Helden-Henningheim L, *et al.* (1979) "Recognition of a non-HLA-ABC antigen present on B and T lymphocytes and monocytes only detectable with the indirect immunofluorescence test" *Vox Sang*. 36(3): page 150-8.
- Fadeyi EA, De Los Angeles Muniz M, Wayne AS, Klein HG, Leitman SF and Stroncek DF. (2007) "The transfusion of neutrophil-specific antibodies causes leukopenia and a broad spectrum of pulmonary reactions" *Transfusion*. 47(3): page 545-50.
- Flesch BK, Doose S, Siebert R, Ntambi E and Neppert J. (2002) "FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda" *Transfusion*. 42(4): page 469-75.
- Foster CB, Lehrnbecher T, Mol F, *et al.* (1998) "Host defense molecule polymorphisms influence the risk for immune-mediated complications in chronic granulomatous disease" *J Clin Invest*. 102(12): page 2146-55.
- Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, *et al.* (1992) "Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fc gamma receptor III deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia" *Blood*. 79(8): page 2131-4.
- Fung YL, Goodison KA, Wong JK and Minchinton RM. (2003) "Investigating transfusion-related acute lung injury (TRALI)" *Intern Med J*. 33(7): page 286-90.
- Fung YL, Pitcher LA, Willett JE, *et al.* (2003) "Alloimmune neonatal neutropenia linked to anti-HNA-4a" *Transfus Med*. 13(1): page 49-52.
- Goldschmeding R, van Dalen CM, Faber N, *et al.* (1992) "Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils" *Br J Haematol*. 81(3): page 336-45.
- Gottschall JL, Triulzi DJ, Curtis B, *et al.* (2011) "The frequency and specificity of human neutrophil antigen antibodies in a blood donor population" *Transfusion*. 51(4): page 820-7.
- Greinacher A, Wesche J, Hammer E, *et al.* (2010) "Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a" *Nat Med*. 16(1): page 45-8.

- Hadley AG, Holburn AM, Bunch C and Chapel H. (1986) "Anti-granulocyte opsonic activity and autoimmune neutropenia" *Br J Haematol.* 63(3): page 581-9.
- Hadley AG, Poole GD, Amphlett NW and Lucas GF. (1992) "The use of interferon-gamma-treated U937 cells in chemiluminescence assays to detect red cell, platelet and granulocyte antibodies of potential clinical significance" *Clin Lab Haematol.* 14(4): page 315-26.
- Han KS and Um TH. (1997) "Frequency of neutrophil-specific antigens among Koreans using the granulocyte indirect immunofluorescence test (GIFT)" *Immunohematology.* 13(1): page 15-6.
- Han TH, Chey MJ and Han KS. (2006) "A case of neonatal alloimmune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-1a (HNA-1a) antibody" *J Korean Med Sci.* 21(2): page 351-4.
- Han TH, Chey MJ and Han KS. (2006) "Granulocyte antibodies in Korean neonates with neutropenia" *J Korean Med Sci.* 21(4): page 627-32.
- Han TH and Han KS. (2006) "Gene frequencies of human neutrophil antigens 4a and 5a in the Korean population" *Korean J Lab Med.* 26(2): page 114-8.
- Hauck B, Philipp A, Eckstein R, *et al.* (2011) "Human neutrophil alloantigen genotype frequencies among blood donors with Turkish and German descent" *Tissue Antigens.* 78(6): page 416-20.
- Hessner MJ, Curtis BR, Endean DJ and Aster RH. (1996) "Determination of neutrophil antigen gene frequencies in five ethnic groups by polymerase chain reaction with sequence-specific primers" *Transfusion.* 36(10): page 895-9.
- Hillyer C, Silberstein L, Ness P, Anderson K and Roback J. (2007) *Blood Banking and Transfusion Medicine: Basic Principle & Practice.* Human leukocyte and granulocyte antigens and antibodies: the HLA and HNA systems. Wang E, Adams S, Marincola F and Stroncek D. Philadelphia, Churchill Livingstone: page 129-56.
- Huizinga TW, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D and von dem Borne AE. (1990) "Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils" *J Clin Invest.* 86(2): page 416-23.

- Huizinga TW, Kleijer M, Tetteroo PA, Roos D and von dem Borne AE. (1990) "Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc gamma receptor III (CD16)" *Blood*. 75(1): page 213-7.
- Kissel K, Hofmann C, Gittinger FS, Daniels G and Bux J. (2000) "HNA-1a, HNA-1b, and HNA-1c (NA1, NA2, SH) frequencies in African and American Blacks and in Chinese" *Tissue Antigens*. 56(2): page 143-8.
- Kissel K, Santoso S, Hofmann C, Stroncek D and Bux J. (2001) "Molecular basis of the neutrophil glycoprotein NB1 (CD177) involved in the pathogenesis of immune neutropenias and transfusion reactions" *Eur J Immunol*. 31(5): page 1301-9.
- Kline WE, Press C, Clay M, Keashen-Schnell M, Hackel E and McCullough J. (1986) "Three sera defining a new granulocyte-monocyte-T-lymphocyte antigen" *Vox Sang*. 50(3): page 181-6.
- Koene HR, Kleijer M, Roos D, de Haas M and von dem Borne AE. (1998) "Fc gamma RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc gamma RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals" *Blood*. 91(2): page 673-9.
- Kupatawintu P, Pheancharoen S, Srisuddee A, Tanaka H, Tadokoro K and Nathalang O. (2010) "HLA-A, -B, -DR haplotype frequencies in the Thai Stem Cell Donor Registry" *Tissue Antigens*. 75(6): page 730-6.
- Lalezari P and Bernard GE. (1965) "Identification of a specific leukocyte antigen: another presumed example of 5b" *Transfusion*. 5(2): page 135-42.
- Lalezari P. (1977) "Neutrophil antigens: immunology and clinical implications" *Prog Clin Biol Res*. 13: page 209-25.
- Lalezari P, Murphy GB and Allen FH. (1971) "NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia" *J Clin Invest*. 50(5): page 1108-15.
- Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, *et al.* (1999) "Variant genotypes of the low-affinity Fc gamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc gamma receptor polymorphisms in control and disease populations" *Blood*. 94(12): page 4220-32.
- Lucas G, Rogers S, de Haas M, Porcelijn L and Bux J. (2002) "Report on the Fourth International Granulocyte Immunology Workshop: progress toward quality assessment" *Transfusion*. 42(4): page 462-8.

- Lucas G, Rogers S, Evans R, Hambley H and Win N. (2000) "Transfusion-related acute lung injury associated with interdonor incompatibility for the neutrophil-specific antigen HNA-1a" *Vox Sang.* 79(2): page 112-5.
- Lucas GF. (1994) "Prospective evaluation of the chemiluminescence test for the detection of granulocyte antibodies: comparison with the granulocyte immunofluorescence test" *Vox Sang.* 66(2): page 141-7.
- Lucas GF and Metcalfe P. (2000) "Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms" *Transfus Med.* 10(3): page 157-74.
- Marin L, Torio A, Muro M, *et al.* (2005) "Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b and HLA antibodies" *Pediatr Allergy Immunol.* 16(3): page 279-82.
- Matsuo K, Procter J and Stroncek D. (2000) "Variations in genes encoding neutrophil antigens NA1 and NA2" *Transfusion.* 40(6): page 645-53.
- Moritz E, Norcia AM, Cardone JD, *et al.* (2009) "Human neutrophil alloantigen systems" *An Acad Bras Cienc.* 81(3): page 559-69.
- Nagarajan S, Chesla S, Cobern L, Anderson P, Zhu C and Selvaraj P. (1995) "Ligand binding and phagocytosis by CD16 (Fc gamma receptor III) isoforms. Phagocytic signaling by associated zeta and gamma subunits in Chinese hamster ovary cells" *J Biol Chem.* 270(43): page 25762-70.
- Norcia AM, Sugano EY, Chiba AK, *et al.* (2009) "Human neutrophil alloantigen-1a, -1b, -2, -3a and -4a frequencies in Brazilians" *Tissue Antigens.* 74(5): page 404-7.
- Nordhagen R, Conradi M and Dromtorp SM. (1986) "Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b" *Vox Sang.* 51(2): page 102-7.
- Pocock CF, Lucas GF, Giles C, *et al.* (2001) "Immune neutropenia associated with anti-human neutrophil antigen-2a (NB1) antibodies following unrelated donor stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia: perpetuation by granulocyte colony-stimulating factor" *Br J Haematol.* 113(2): page 483-5.
- Ravetch JV and Perussia B. (1989) "Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions" *J Exp Med.* 170(2): page 481-97.

- Reil A, Wesche J, Greinacher A and Bux J. (2011) "Geno- and phenotyping and immunogenicity of HNA-3" *Transfusion*. 51(1): page 18-24.
- Romphruk AV, Puapairoj C, Romphruk A, Barasrux S, Urwijitaroon Y and Leelayuwat C. (1999) "Distributions of HLA-DRB1/DQB1 alleles and haplotypes in the north-eastern Thai population: indicative of a distinct Thai population with Chinese admixtures in the central Thais" *Eur J Immunogenet*. 26(2-3): page 129-33.
- Sachs UJ, Reil A, Bauer C, Bux J, Bein G and Santoso S. (2005) "Genotyping of human neutrophil antigen-5a (Ond)" *Transfus Med*. 15(2): page 115-7.
- Salmon JE, Edberg JC and Kimberly RP. (1990) "Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities" *J Clin Invest*. 85(4): page 1287-95.
- Silliman CC, Curtis BR, Kopko PM, *et al.* (2007) "Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model" *Blood*. 109(4): page 1752-5.
- Silliman CC, Fung YL, Ball JB and Khan SY. (2009) "Transfusion-related acute lung injury (TRALI): current concepts and misconceptions" *Blood Rev*. 23(6): page 245-55.
- Simsek S, van der Schoot CE, Daams M, *et al.* (1996) "Molecular characterization of antigenic polymorphisms (Ond(a) and Mart(a)) of the beta 2 family recognized by human leukocyte alloantisera" *Blood*. 88(4): page 1350-8.
- Steffensen R, Gulen T, Varming K and Jersild C. (1999) "Fc gamma RIIIB polymorphism: evidence that NA1/NA2 and SH are located in two closely linked loci and that the SH allele is linked to the NA1 allele in the Danish population" *Transfusion*. 39(6): page 593-8.
- Stroncek D. (2002) "Neutrophil alloantigens" *Transfus Med Rev*. 16(1): page 67-75.
- Stroncek D and Bux J. (2002) "Is it time to standardize granulocyte alloantigen nomenclature?" *Transfusion*. 42(4): page 393-5.
- Tsuno H, Matsuhashi M and Takahashi K. (2011) "Granulocyte antibody detection – the role of MPHA" *ISBT Science Series*. 6: page 387-90.
- Van Leeuwen A, Eernisse JG and Van Rood JJ. (1964) "A New Leucocyte Group with Two Alleles: Leucocyte Group Five" *Vox Sang*. 9(4): page 431-46.

- Velickovic Z. (2010). "Tissue typing: method" [Online]. Available:  
[http://www.tissuotyping.org.au/tt\\_methods.html](http://www.tissuotyping.org.au/tt_methods.html) [2010, January]
- Verheugt FW, von dem Borne AE, Decary F and Engelfriet CP. (1977) "The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test" *Br J Haematol.* 36(4): page 533-44.
- Wang LY, Wang CL, Chu CC, *et al.* (2009) "Primary autoimmune neutropenia in children in Taiwan" *Transfusion.* 49(5): page 1003-6.
- Xia W, Bayat B, Sachs U, *et al.* (2011) "The frequencies of human neutrophil alloantigens in the Chinese Han population of Guangzhou" *Transfusion.* 51(6): page 1271-7.
- Yan L, Zhu F, Jin L, Lv Q and Fu Q. (2005) "FCGR3B polymorphism in three ethnic Chinese populations" *Immunohematology.* 21(1): page 25-8.
- Zupanska B, Uhrynowska M, Guz K, *et al.* (2001) "The risk of antibody formation against HNA1a and HNA1b granulocyte antigens during pregnancy and its relation to neonatal neutropenia" *Transfus Med.* 11(5): page 377-82.

## ภาคผนวก ก.

### วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

#### 1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

- |   |   |
|---|---|
| 1.1 Disposable pipette tips 10 $\mu$ l  | (Cat no.2GB-200200, Bioline, Finland)         |
| 1.2 Disposable pipette tips 0.2 $\mu$ l | (Cat no.2GB-200200, Bioline, Finland)         |
| 1.3 Glove                               | (Cat no. FE 0788, Dr.Boo Co., Thailand)       |
| 1.4 Microcentrifuge tube, 1.5 ml        | (Cat no.801500, Bioline, Finland)             |
| 1.5 PCR tube, 0.2 ml                    | (Cat no.60082, Bioline, Finland)              |
| 1.6 PCR plate, 96 wells                 | (Cat no.749C7-7362, Labcon Petaluma, CA, USA) |
| 1.7 Pipette tips 200 $\mu$ l            | (Cat no.2GB-200200, Bioline, Finland)         |
| 1.8 Pasture pipette                     |   |

#### 2. เครื่องมือที่ใช้

- |                            |   |
|----------------------------|---|
| 2.1 Autoclave              | (SX-700, Tomy, Meditop Co., Ltd.)   |
| 2.2 Autopipette            |   |
| 2.3 Centrifuge             | (Table-top centrifuge, Kokusan, Japan)  |
| 2.4 Electrophoresis system | (Mupid-exu, Advance, Japan)   |
| 2.5 Freezer -20 °C         | (SF-C1497 (GYN), SANYO, บริษัท ชัน โยคอมเมอ์เซียโซลูชั่นไทยแลนด์ จำกัด ประเทศไทย) |
| 2.6 Gel document           | (UV Transluminator, vilber lourmat, France)                                       |
| 2.7 Microcentrifuge        | (Hsiangtai, Lio Lab, Thailand)  |
| 2.8 Mixer, Vortex          | (Genie 2, Vortex, พี.อินเตอร์เทรด อีควิปเมนท์ จำกัด, ประเทศไทย)                   |
| 2.9 Microwave              | (M1711N, Samsung บริษัท ไทยซัมซุง อิเล็กทรอนิกส์ จำกัด, ประเทศไทย)                |
| 2.10 Refrigerator 4 °C     | (SBC-2DB, SANYO, บริษัท ชัน โยคอมเมอ์เซียโซลูชั่นไทยแลนด์ จำกัด ประเทศไทย)        |

2.11 Thermal cycle (Mastervapo.protect, Eppendorf, Germany)

### 3. นํ้ายาและสารเคมี

3.1 Agarose gel (Cat no. 0000093376, Vivantis, Malaysia)

3.2 Ammonium sulfate

3.3 Boric acid (CAS # 203667, Merck, Germany)

3.4 Citric acid

3.5 Dextrose (monohydrate)

3.6 dNTPs (Lot no.4068, Vivantis, Malaysia)

3.7 EDTA (Lot no.8P001784, Applichem, Germany)

3.8 Ethidium bromide (Cat no.1376B017, Vivantis, Malaysia)

3.9 Guanidine Thiocyanate (CAS # 593840, Bio Basic inc., Canada)

3.10 HCl

3.11 MgCl<sub>2</sub> (Lot no.2038, Vivantis, Malaysia)

3.12 MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O

3.13 Primer (Bio Basic inc., Canada)

3.14 Sodium Chloride (Cat no. 1208303, Univar, ajaxfinechem Pty Ltd., Australia)

3.15 Sodium-N-Lauroyl Sarcosinate

3.16 Steriled distill water

3.17 Sucrose (CAS# 57501, Bio Basic inc., Canada)

3.18 *Taq* polymerase (Lot no.2122-02, Vivantis, Malaysia)

3.19 Tris base (Cat no.9680T, Research organics, USA)

3.20 Tri-sodium (dehydrate) citrate

3.21 Triton X-100 (Lot no. 430308/1 24601, Fluka Chemika, Switzerland)

3.22 Tween-20

3.23 1X loading dye (Lot no.326281/11193, Fluka Chemika, Germany)

3.24 2-Mercaptoethanol (CAS # 80242, Applichem, Germany)

3.25 70%alcohol (Cat no. 700472, ศิริปญญา, Thailand)

**ภาคผนวก ข.**  
**การเตรียมสารเคมี**

**1. การเตรียมบัฟเฟอร์และสารละลาย**

**1.1 การเตรียม 5 M NaCl (500 มล.)**

ชั่ง	NaCl	146.1	กรัม
------	------	-------	------

- ละลาย NaCl ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

**1.2 การเตรียม 1M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (1,000 มล.)**

ชั่ง	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	203.3	กรัม
------	--------------------------------------	-------	------

- ละลาย MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มล.
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

**1.3 การเตรียม 0.5M EDTA pH 8.0 (500 มล.)**

ชั่ง	EDTA	93.06	กรัม
------	------	-------	------

- ละลาย EDTA ในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- คนให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer
- ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 8.0 ด้วยสาร NaOH
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

#### 1.4 การเตรียม 1M Tris-HCl pH 7.5 (500 มล.)

ชั่ง	Tris base	30.25	กรัม
------	-----------	-------	------

- ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 7.5 ด้วยสาร HCl
- วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อสารละลายเย็นลงแล้วจึงปรับ pH อีกครั้ง
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานอย่างน้อย 1 ปี

## 2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

### 2.1 การเตรียม 5x Red cell lysis buffer (5x RCLB)

ชั่ง	Sucrose	547	กรัม
ตวง	Triton X-100	50	มล.
ตวง	1M MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25	มล.
ตวง	1M Tris-HCl pH 7.5	60	มล.

- ละลาย sucrose ในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มล.
- ใส่ส่วนประกอบที่เหลือ (TritonX-100, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O และ Tris-HCl) ลงไปสารละลาย sucrose
- ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

\* Working solution (1x RCLB) เตรียมได้จากการละลาย 5X RCBL ปริมาตร 100 มล. กับ น้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.

## 2.2 การเตรียม Nuclear membrane lysis buffer (NMLB) (800 มล.)

ชั่ง	Guanidine Thiocyanate	378.1	กรัม
ตวง	1M Tris-HCl, pH 7.6	9.6	มล.
ตวง	0.5M EDTA, pH 8.0	19.2	มล.
ตวง	5M NaCl	60	มล.
ตวง	2-Mercaptoethanol	5.6	มล.
ชั่ง	Sodium-N-Lauroyl Sarcosinate	4	กรัม

- ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งมาเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

## 2.3 การเตรียม 1x TE-buffer (200 มล.)

ตวง	1M Tris-HCl pH 7.5	0.5	มล.
ตวง	0.5M EDTA	100	ไมโครลิตร

- ผสมสารละลายทั้งสองกับน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มล.
- นำสารละลายไปนึ่งมาเชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 3. การเตรียม PCR Amplification solutions

### 3.1 การเตรียม 10X PCR buffer

ชั่ง	Tris base	40.568	กรัม
ชั่ง	Ammonium sulfate	10.96	กรัม
ตวง	Tween-20	5	มล.

- ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น ปริมาตร 400 มล.
- ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 8.8 ด้วยสาร HCl
- เติมสาร Ammonium sulfate ลงในสารละลาย

- นำสารละลายไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22  $\mu\text{M}$
- เติม Tween-20 ลงในสารละลายและปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มล.
- นำสารละลายไปนิ่งมาเชื้อ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$

#### 4. การเตรียม Electrophoretic analysis solutions

##### 4.1 การเตรียม 10x TBE buffer (stock solution) (1000 มล.)

ชั่ง	Tris base	108	กรัม
ชั่ง	Boric acid	55	กรัม
ตวง	0.5M EDTA pH 8.0	40	มล.

- ละลาย Tris base และ Boric acid ในน้ำกลั่น ปริมาตร 700 มล.
- เติม EDTA ลงไปในสารละลายและปรับให้ได้ปริมาตร 1000 มล. ด้วยน้ำกลั่น
- นำสารละลายไปนิ่งมาเชื้อ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

\* Working solution (0.5 X TBE) เตรียมได้จากการละลาย 10X TBE ปริมาตร 50 มล. กับ น้ำกลั่น ปริมาตร 950 มล.

##### 4.2 การเตรียม 50mg% Ethidium bromide solutions (20 มล.)

ชั่ง	ethidium bromide	10	กรัม
ตวง	PBS, pH 7.4	18	มล.

- ละลาย ethidium bromide และ PBS ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 2 มล.
- คนด้วย magnetic stirrer จนกระทั่งแน่ใจว่าละลายหมดแล้ว
- เก็บในขวดสีชาหรือใช้ aluminum foil พันรอบขวดและเก็บที่อุณหภูมิ  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

**ภาคผนวก ค.**  
**ประวัติย่อผู้วิจัย**

**คณะผู้วิจัย**

**หัวหน้าโครงการวิจัย**

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)	นางสาวชลันดา กองมะเรียง
(ภาษาอังกฤษ)	Miss Chalunda Kongmaroeng
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก) มหาวิทยาลัยมหิดล ปร.ด. (ชีวเวชศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่ง	อาจารย์ประจำ
สถานที่ทำงาน	กลุ่มวิชาธนาคารโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โทรศัพท์ 02-3126300 ต่อ 1221

**ผู้วิจัย**

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย)	นางเกษร คำแก่น
(ภาษาอังกฤษ)	Mrs. Kesorn Kumkaen
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ตำแหน่ง	นักเทคนิคการแพทย์ ระดับชำนาญการ
สถานที่ทำงาน	ห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลระยอง อ.เมือง จ.ระยอง โทรศัพท์ 038-611104 ต่อ 2079, 2080