บทนำ

Human leukocyte antigen (HLA) เป็นแอนติเจนที่ถูกควบคุมโดยกลุ่มของยีน Major histocompatibility complex (MHC) ซึ่งอยู่บนแขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6[1] แอนติเจน HLA แบ่งเป็น 2 class ได้แก่ class I ประกอบด้วย HLA-A, HLA-B, HLA-C พบได้บนผิวเซลล์ที่มีนิวเคลียสเกือบทุกชนิดรวมทั้งเกล็ดเลือด[2-5] นับเป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาการปฏิเสธของเนื้อเยื่อ (rejection phenomenon) เนื่องจากสามารถถูกจับได้โดย cytotoxic-T lymphocyte (T8) [6] นอกจากนี้แล้วยังเป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญในการจับ peptide antigen จาก endogeneous antigen โดยจะจับ peptide ที่บริเวณ endoplasmic reticulum และส่งออกที่ผิวเซลล์[7-9] ส่วนแอนติเจน HLA class II ประกอบด้วย HLA-DR, HLA-DQ และ HLA-DP พบได้บนผิวของ B-lymphocyte, acitvated T lymphocyte, monocyte, macrophage และเซลล์อื่น ๆ เป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญ ต่อขบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายเนื่องจากมีหน้าที่จับ peptide antigen จาก exogeneous antigen โดยจะจับ peptide ในบริเวณ ของ endosome และส่งออกที่ผิวเซลล์ เพื่อให้เซลล์ชนิดลิมโฟไซย์ CD4 T cell สามารถเข้าจับได้ต่อไป[7-9]

ยีน MHC class I ประกอบด้วย classical gene จำนวน 3 ชนิด (HLA-A, -B, -C) และ non classical gene จำนวน 7 ชนิด[10-14] ในปัจจุบันนี้มีการค้นพบยีน HLA-A จำนวน 83 ชนิด HLA-B จำนวน 186 ชนิด HLA-Cw จำนวน 44 ชนิด HLA-E จำนวน 5 ชนิด และ HLA-Gจำนวน 7 ชนิด [15] การตรวจหาแอนติเจน HLA class I ในปัจจุบันยังนิยมใช้วิธี microlymphocytotoxicity test ซึ่งเป็นเทคนิคทางซีโรโลยี่ อันมีข้อจำกัดหลายประการ จึงมีผู้พัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจสอบยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน HLA class I โดยได้ทำการ sequence ยีน HLA class I เป็นผลสำเร็จในปีคศ. 1992[16] และ พัฒนาเทคนิค polymerase chain reaction-amplification refractory mutation system (PCR-ARMS) สำหรับตรวจ HLA-A [17,18] และ HLA-B [19], polymerase chain reaction-specific sequence oligonucleotide probe (PCR-SSO) สำหรับตรวจ HLA-A,-B[20,21] และ polymerase chain reaction-specific sequence primer polymorphism (PCR-SSP) สำหรับตรวจ HLA-C[22]

การศึกษายีน MHC class I และ class II มีประโยชน์มากมายในทางการแพทย์ เช่น การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ (transplantation) [23] ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ยีน MHC กับการเกิดโรค (disease susceptibility/resistance) [24-27] เช่น โรคในกลุ่มภูมิคุ้มกันต่อตนเอง (autoimmune disease) โรคมะเร็ง และโรคติดเชื้อหลายชนิด และสามารถนำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพ่อลูก (paternity testing) ได้อย่างแม่นยำถึงประมาณร้อยละ 93 [28] นอกจากนี้การตรวจแอนติเจน HLA ยังเป็นหลักฐานทางมนุษยวิทยา (anthropology) [29] เนื่องจากการกระจายของแอนติเจน HLA แตกต่างกันจนเป็นลักษณะจำเพาะของแต่ละเชื้อชาติ ทำให้ทราบถึงเผ่าพันธุ์ดั้งเดิมของแต่ละเชื้อชาติ ตลอดจนหลักฐานการอพยพย้ายถิ่นฐานเป็นต้น

คณะผู้วิจัยได้รายงานการศึกษาแอนติเจน HLA-A และ B ในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ(ไทยอีสาน) ด้วยวิธี microlymphocytotoxicity test [30] ซึ่งพบแอนติเจนแตกต่างจากกลุ่มชาวไทย [31] และกลุ่มชาวไทยเชื้อสายจีน [32] และจากข้อมูลที่ได้ในรายงานดังกล่าวมีประเด็นที่น่าสนใจคือ รูปแบบของปฏิกิริยาของแอนติเจนเดียวกัน (allele เดียวกัน) มีความแตกต่างกัน ในลักษณะความแรงของปฏิกิริยา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ายีน HLA ในประชากรกลุ่มนี้มี subtype ชนิดต่าง ๆ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์จะศึกษาแอนติเจน HLA class I ในระดับยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล (polymerase chain reaction - amplification refractory mutation system:PCR-ARMS) เพื่อให้ได้ข้อมูลในระดับยีนของคนไทยที่มีภูมิลำเนาในภาคอีสาน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาความถี่ของยีนที่ควบคุมแอนติเจน HLA class I locus A, B, C ในชาวไทย ด้วยเทคนิค (polymerase chain reaction - amplification refractory mutation system: PCR-ARMS)

วัสดุและวิธีวิจัย

1. ตัวอย่างทดสอบ

ใช้ตัวอย่างทดสอบกลุ่มเดียวกับที่ใช้ในการศึกษา แอนติเจน HLA ด้วยวิธีซีโรโลยี [30] โดยมีการคัดเลือกตัวอย่างดังนี้

คัดเลือกตัวอย่างจากกลุ่มประชากรในภาคอีสานจำนวน 100 ราย โดยสุ่มจากประชากรแบ่งตามจังหวัดต่าง ๆ ทั่วภาคอีสาน ตามสัดส่วนของประชากรในจังหวัดนั้น ๆ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างทดสอบใช้เพียง 100 ราย จึงได้พยายามเก็บตัวอย่างให้กระจายมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ โดยเลือกดังนี้

ก. กลุ่มนักศึกษามหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งจัดเป็นศูนย์รวมของชาวไทยอีสานจากจังหวัดต่าง ๆ จะเข้ามาศึกษาร่วมกัน และได้สุ่มนักศึกษาจากคณะเทคนิคการแพทย์ ซึ่งมีนักศึกษาประมาณ 400 คน

ข. กลุ่มนักเรียนจากโรงเรียนพลตำรวจภูธร ภาค 4

ค. กลุ่มผู้มาเข้าร่วมสัมมนาทางคลังเลือดที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งมาจากทุกภาคของประเทศ ส่วนใหญ่มาจากภาคอีสาน

ง. กลุ่มเจ้าหน้าที่ที่ปฏิบัติงานในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

จ. กลุ่มประชาชนที่มาตรวจร่างกาย เพื่อสมัครไปทำงานยังต่างประเทศ

ฉ. กลุ่มประชาชนที่มาบริจาคโลหิตที่คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

จากจำนวนตัวอย่าง 100 ราย จะแบ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ นครราชสีมา 12 ราย, ขอนแก่น อุบลราชธานี อย่างละ 8 ราย, อุดรธานี บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ อย่างละ 7 ราย, ร้อยเอ็ด 6 ราย, ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ สกลนคร อย่างละ 5 ราย, เลย นครพนม ยโสธร อย่างละ 3 ราย, มุกดาหาร อำนาจเจริญ หนองบัวลำภู อย่างละ 2 ราย

2. วิธีการเก็บตัวอย่าง

1. เก็บตัวอย่างทดสอบโดยเจาะเก็บโลหิต รายละประมาณ 10 มล. ในน้ำยากันเลือดแข็งตัว acid citrate dextrose (ACD) โดยมีสัดส่วนของโลหิตต่อน้ำยา ACD เท่ากับ 9:1

2. นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยก buffy coat ที่ความเร็ว 2400 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูด เก็บ buffy coat เพื่อนำไปสกัด DNA

2. น้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ

2.1 5xRBC lysis buffer ประกอบด้วย sucrose หนัก 109.4 กรัม, Triton X-100 ปริมาตร 10 มล., 1M $MgCl_2$, $6H_2O$ ปริมาตร 5 มล., 1M Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 12 มล. เติม double distilled water ให้ครบ 200 มล.

2.2 5xProteinase K buffer ประกอบด้วย 5M NaCl ปริมาตร 15 มล., 5M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 48 มล. เติม double distilled water ให้ครบ 200 มล.

2.3 TE buffer ประกอบด้วย 1M Tris-HCl pH 7.5 ปริมาตร 2 มล., 5M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.4 มล. เติม double distilled water ให้ครบ 200 มล.

2.4 Loading buffer ประกอบด้วย 30% glycerol และ 0.05% Bromphenol blue

2.5 10xTBE buffer ประกอบด้วย Tris base หนัก 108 กรัม, Boric acid หนัก 55 กรัม, 5M EDTA pH 8.0 ปริมาณ 40 มล. เติม double distilled water ให้ครบ 200 มล.

2.6 Taq polymerase ของ Promega, Medison, WI, USA.

2.7 primer mixes จาก 12th International Histocompatibility Workshop (IHW) protocol

2.8 10xPCR buffer ประกอบด้วย 670mM Tris base, 166mM Ammonium sulfate, 1% Tween

2.9 TDMH buffer สำหรับการทดสอบ 1 ราย ประกอบด้วย 10xPCR buffer ปริมาตร 123.5 ul, dNTP(25mM) ปริมาตร 8.77 ul, 25m $mMgCl_2$ ปริมาตร 98.65 ul และ DDW ปริมาตร 244.5 ul

3. วิธีการศึกษา

นำ buffer coat ที่เก็บไว้มาสกัด DNA โดยวิธี salting out[33] จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไป amplified ในเครื่อง PCR โดยใช้ specific primers จำนวน 32 คู่ สำหรับ locus A, จำนวน 27 คู่ สำหรับ locus B และจำนวน 23 คู่ สำหรับ locus Cw ทำการตรวจสอบ

amplified DNA ที่ได้ด้วย gel electrophoresis เพื่อดู specific band ทำการวิเคราะห์ผลที่ได้

3.1 การสกัด DNA (DNA extraction)[33]

-เติม 5xRBC lysis buffer ปริมาตร 1 มล. ผสมกับ buffy coat ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มล.

-เขย่ากลับไปมาเบา ๆ นาน 30 วินาที เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแตก

-นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

-ดูดหรือเทน้ำสีแดงใส ส่วนบนทิ้งไป

-เติม double distilled water (DDW) ปริมาณ 1 มล. และนำไปปั่นอีกครั้งหนึ่ง

- ดูดหรือเทน้ำสีแดงใส ส่วนบนทิ้งไป
- เติม 5x proteinnase K buffer ปริมาตร 80 ไมโครลิตร

  proteinase K ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

  20% SDS ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

  DDW ปริมาตร 240 ไมโครลิตร
- นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55°ซ. นาน 30 นาที โดยเขย่าเบา ๆ ตลอดเวลา
- เติม 5M NaCl ปริมาตร 120 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงเป็นเวลานาน 15 วินาที
- นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที เท supernatant ใส่หลอดใหม่
- นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เท supernatant ใส่หลอดใหม่
- เติม absolute ethanol ปริมาตร 1 มล. กลับหลอดไปมาเบา ๆ จะเห็นเส้น DNA บาง ๆ นำหลอดไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เท supernantant ทิ้งไป
- ล้างด้วย 0.5 มล. 70% ethanol นำไปปั่นอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เท supernantant ทิ้งไป
- ดูด ethanol ออกให้หมด เติม TE buffer ประมาณ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ DNA ละลาย

3.2 การวัดความเข้มข้นของ DNA

นำ DNA ที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วย DDW ปริมาตร 490 ไมโครลิตร (dilution 1:50) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไปวัดค่า OD. ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ wavelength 260 nm.

ค่าความเข้มข้น = OD x 50 x dilution

= OD x 2500

เช่น วัดค่า OD ได้ = 0.045

ค่าความเข้มข้น = 0.045 x 2500

= 112.5 ng/ul

3.3 การเจือจาง DNA เพื่อทำ PCR (working DNA)

ดูดสารละลาย TDMH buffer ปริมาตร 450 ul เติม DNA(ความเข้มข้น 200mg/ml) ปริมาตร 45 ul และเติม DDW ปริมาตร 224 ul

3.4 การทำ PCR

1. เติม specifc primer ปริมาตร 5 ul ในหลอด microtube (สำหรับ A จะมี specific primer อยู่ 32 คู่, B จะมี specific primer อยู่ 27 คู่, และ Cw จะมีอยู่ 23 คู่) เติม mineral oil ลงไปประมาณ 25 ul.
2. เติมเอ็นไซม์ Taq polymerase 5 ul ใน working DNA เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ vortex
3. เติมส่วนผสมของ DNA-Taq polymerase ปริมาตร 8 ul. ลงไปในแต่ละหลอด
4. ปิดฝาให้แน่น และตรวจสอบดูว่าส่วนผสมเข้ากันดี
5. นำหลอดไปใส่ในเครื่อง PCR ทำการ amplify DNA จำนวน 30 รอบ โดยใช้ขั้นตอนดังนี้

จำนวน 1 รอบที่	denature 96°ซ นาน 2 นาที
จำนวน 5 รอบที่	denature 96°ซ นาน 30 วินาที
	annealing 68°ซ นาน 60 วินาที
	extension 72°ซ นาน 40 วินาที
จำนวน 21 รอบที่	denature 96°ซ นาน 30 วินาที
	annealing 65°ซ นาน 60 วินาที

extension 72°ซ นาน 40 วินาที

จำนวน 4 รอบที่ denature 96°ซ นาน 30 วินาที

annealing 55°ซ นาน 75 วินาที

extension 72°ซ นาน 120 วินาที

จำนวน 1 รอบที่ extension 72°ซ นาน 10 นาที

3.5 ขั้นตอนการตรวจสอบ DNA amplification

1. เติม loading buffer จำนวน 5 ul ลงในแต่ละหลอด
2. เติมสารผสม DNA/loading buffer ลงในหลุมของ agarose gel
3. จากนั้นนำไป run gel electrophoresis ที่ 100 volt นานประมาณ 30 นาที
4. นำแผ่น gel ไปดูผลภายใต้เครื่อง UV transiluminator จะเห็นแถบของ DNA ติดสีแดง
5. ถ่ายรูปด้วยกล้องโพลารอยด์ และนำไปแปลผลการทดสอบ

4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ค่า phenotype frequency (PF) คำนวณจาก จำนวน phenotype ที่พบหารด้วย จำนวน N

4.2 ค่า gene frequency (GF) คำนวณจาก

GF = 1- $\sqrt{1-PF}$

4.3 ค่า linkage disequilibrium (delta) คำนวณจากตาราง 2x2

delta $= \sqrt{\frac{d}{N}} - \sqrt{(1/N^2)(b+d)(c+d)}$

4.4 ทดสอบ significant linkage disequilibrium โดยใช้การทดสอบ X^2

ผลการศึกษา

เมื่อนำตัวอย่างทดสอบทั้งหมดมาตรวจหายีนที่ควบคุมแอนติเจน HLA-A,-B และ Cw สามารถตรวจพบ HLA-A ได้ 12 alleles HLA-B ได้ 20 alleles และ Cw ได้ 14 alleles เมื่อนำผลที่ได้ไปคำนวณค่าความถี่ของยีนได้ผลตามตารางที่ 1,2 และ 3 พบว่าความถี่ของยีน HLA-A ที่พบได้สูงในประชากรกลุ่มนี้คือ HLA-A*11 เท่ากับ 0.2584, A*24 เท่ากับ 0.2450, A*0207 เท่ากับ 0.1398 และ A*0203 เท่ากับ 0.1282 ขณะเดียวกันความถี่ของ A*0205, A*3401 และ A*3101 พบได้ต่ำมาก (ดังตารางที่ 1) จากตารางที่ 2 พบว่าความถี่ของยีน HLA-B* ที่พบได้สูงคือ B*4601 เท่ากับ 0.1398 B*15(02,08,11,15) เท่ากับ 0.0890 B*35 และ B*55/56 เท่ากับ 0.0780 โดยที่ B*57, B*5001 และ B*4801 พบได้ต่ำ ส่วนความถี่ของยีน HLA-Cw ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่า ยีนที่พบได้สูงในประชากรกลุ่มนี้คือ Cw*07(01-03) เท่ากับ 0.2, Cw*01 เท่ากับ 0.1876, Cw*04 เท่ากับ 0.1225 และ Cw*0304 เท่ากับ 0.0945

เมื่อทำการวิเคราะห์ยีนที่มีโอกาสพบอยู่ด้วยกันมากกว่าความคาดหมายจากความถี่ของยีน (linkage disequilibrium:LD) จาก HLA-A*12 alleles และ HLA-B* 20 alleles พบ 7 haplotype ที่มี significant linkage disequilibrium ($p<0.05$) และมีค่า delta มากกว่า 100 (ตามตารางที่ 4) โดยพบ haplotype HLA-A*0207-B*4601 ได้มากที่สุด จากตารางที่ 5 ซึ่งแสดง HLA-B-C haplotype ที่มี significant LD พบว่า HLA-B*4601-Cw*01 พบได้บ่อยที่สุด

เมื่อทำการวิเคราะห์ถึง HLA-A,-B,-Cw haplotype ที่มีโอกาสพบในแต่ละคน (possible haplotype) พบว่ามี 22 haplotypes ที่เป็นไปได้ และ possible haplotype ที่พบได้มากที่สุดคือ A*0207-Cw*01-B*4601

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วท
ศH
447
ว451

บทวิจารณ์

แอนติเจน HLA-class I บนผิวเซลล์ สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีทางซีโรโลยี โดยอาศัยแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ ที่มีความจำเพาะกัน วิธีทางซีโรโลยีสามารถทำได้รวดเร็ว แต่มีข้อด้อยคือ ในบางรายไม่สามารถบอกแอนติเจนที่ชัดเจนได้ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) ของแอนติบอดีที่ใช้หรือบางครั้งไม่สามารถตรวจสอบแอนติเจนบางชนิดได้เนื่องจากขาดแอนติบอดีที่จำเพาะชนิดนั้น ๆ การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจสอบชนิดของยีนได้ถูกนำมาใช้ใน HLA-class II ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และได้ใช้ในการตรวจสอบก่อนการปลูกถ่ายอวัยวะหรือใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของโรคต่าง ๆ [33-38] สำหรับ HLA-class I เทคนิค PCR-ARMS ได้ถูกพัฒนาขึ้นเมื่อไม่นานมานี้ [16,18-22,39,40] และเทคนิคดังกล่าวได้ถูกนำเข้ามาใช้ใน workshop ครั้งที่ 12 ของสมาคม International Histocompatibility ซึ่งใช้ primer จำนวน 32 คู่ สำหรับ HLA-A , 27 คู่ สำหรับ HLA-B [19] , และ 23 คู่ สำหรับ HLA-Cw* การตรวจสอบชนิดของยีนโดยใช้ primer ดังกล่าวยังมีความสามารถตรวจได้ (resolution) ในระดับต่ำถึงระดับกลาง เนื่องจากชนิดของยีน HLA-class I มีมากถึง 200 กว่าชนิด ดังนั้นสำหรับบางยีนจำเป็นต้องมีการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลที่มี high resolution เช่น ยีน B*15 เป็นต้น

ในปัจจุบันนี้ได้มีรายงานการพบ HLA-A จำนวน 83 ชนิด HLA-B 186 ชนิด และ HLA-Cw 42 ชนิด [15] จากการศึกษาครั้งนี้พบ HLA-A 12 ชนิด HLA-B* 20 ชนิด และ HLA-Cw* 14 ชนิด และพบเพียง 1 allele ในแต่ละ Locus จำนวน 29 ราย สำหรับ HLA-A, 10 รายใน HLA-B และ 14 ราย ใน HLACw ซึ่งในตัวอย่างทดสอบดังกล่าว อาจจะมีลักษณะ homozygous gene ใน locus นั้น ๆ หรือเป็นไปได้ว่ายังมียีนอีก allele หนึ่งซึ่งไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี PCR-ARMS ลักษณะเช่นนี้มักพบใน A*11, A*24, B*4601, Cw*07(01-03) และ Cw*01 ซึ่งทั้งหมดเป็น alleles ที่พบได้บ่อยในแต่ละ locus จากรายงานการศึกษาครั้งก่อน [30] ซึ่งใช้ตัวอย่างทดสอบกลุ่มเดียวกันทำการศึกษาด้วยวิธีทางซีโรโลยี พบยีนเพียง 1 allele ในแต่ละ locus จำนวน 36 รายใน HLA-A และ 13 รายใน HLA-B ซึ่งจะเห็นว่า PCR-ARMS สามารถตรวจหาชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้ระหว่างวิธี PCR-ARMS และซีโรโลยี

พบว่าให้ผลไม่สอดคล้องกันสูงถึง 7% ใน HLA และ 20% ใน HLA-B Bozon และ Bunce[22,41] พบว่าอัตราของผลไม่สอดคล้องกันระหว่างวิธีซีโรโลยีและเทคนิค DNA ใน HLA-A พบ 7.1% และใน HLA-B พบ 7.5% จากข้อมูลนี้ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นอัตราของผลไม่สอดคล้องกันใน HLA-B สูงกว่า อาจจะเนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ในวิธีทางซีโรโลยี

ลักษณะ linkage association ระหว่าง HLA-A-HLA-B และระหว่าง HLA-B-HLA-Cw ได้มีรายงานของในแต่ละกลุ่มประชากร HLA-A-B และ HLA-B-Cw haplotypes ในชาวไทยอีสาน จะคล้ายกันที่พบในชาวจีนตอนใต้, ชาวไทยภาคกลาง, ชาวไทยจีน, ชาวเวียดนาม, ชาวจีนสิงคโปร์[31,32,42] และชนิดของ possible class I haplotype ที่พบในชาวไทยอีสาน (A*0207-Cw*-01-B*4601) พบได้สูงเช่นเดียวกับในชาวจีนตอนใต้, ชาวไทย, ชาวเวียดนาม, ชาวจีน, ชาวสิงคโปร์ แต่ต่างจากชาวไทยจีนที่พบ haplotype A33-Cw10-B58 ได้สูง[31,32,42]

ยีนที่ควบคุมแอนติเจน HLA-B*15 ได้มีรายงานการพบมากถึง 37 ชนิด และในประชากรชาวเอเชียตอนใต้ ก็พบได้หลายชนิด สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบ B*15 สูงถึง 25 ราย ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ เท่านั้นคือ B*15(02,08,11,15) และ B*15(01,04-07,12,19,20) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษายีน B*15 ในชาวไทยอีสานด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลอื่น ๆ ต่อไป

โดยสรุปแล้วการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงความถี่ของยีนที่ควบคุมแอนติเจน HLA-A,-B,-Cw ประชากรทั่วไปภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางมนุษยวิทยา ใช้ช่วยในการพิจารณาเลือกอวัยวะในการปลูกถ่ายอวัยวะ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ของยีน MHC กับการเกิดโรคบางชนิดต่อไป

Table 1 HLA-A phenotype and gene frequencies in 100 northeastern Thais

HLA-A*	number positive	Phenotype frequencies	Gene frequencies
0203	24	0.24	0.1282
0205	1	0.01	0.0050
0207	26	0.26	0.1398
11(01,02)	45	0.45	0.2584
24(02,03)	43	0.43	0.2450
26(01,02,04)	4	0.04	0.0202
29(01,02)	3	0.03	0.0151
30(01-03)	6	0.06	0.0305
3101	2	0.02	0.0101
33(01,02)	13	0.13	0.0673
3401	1	0.01	0.0050
7401	3	0.03	0.0151
blank	29	0.29	0.1574

Table 2 HLA-B phenotype and gene frequencies in 100 northeastern Thais

HLA-B*	number positive	Phenotype frequencies	Gene frequencies
07(02-05)	9	0.09	0.0461
13(01,02)	14	0.14	0.0726
15(02,08,11,15)	17	0.17	0.0890
15(01,04-07,12,19,20)	8	0.08	0.0408
18(01,02)	12	0.12	0.0619
27(02-05,06,07,09)	9	0.09	0.0461
35(01-08)	15	0.15	0.0780
38(01,02)	8	0.08	0.0408
39/6701	7	0.07	0.0356
4001	11	0.11	0.0566
40(02,04-06)	5	0.05	0.0253
44(02-04)	7	0.07	0.0356
4601	26	0.26	0.1398
4801	3	0.03	0.0151
5001	1	0.01	0.0050
51/5201	8	0.08	0.0408
5401	4	0.04	0.0202
57(01,02)	1	0.01	0.0050
5801	10	0.10	0.0513
55/56	15	0.15	0.0780
blank	10	0.10	0.0513

Table 3 HLA-C phenotype and gene frequencies in 100 northeastern Thais

HLA-Cw*	number positive	Phenotype frequencies	Gene frequencies
01(01-02)	34	0.34	0.1876
0302	10	0.10	0.0513
0303	4	0.04	0.0202
0304	18	0.18	0.0945
04(01,02)	23	0.23	0.1225
0602	6	0.06	0.0305
07(01-03)	36	0.36	0.2000
0704	11	0.11	0.0566
08(01-03)	18	0.18	0.0945
12(01-02)	5	0.05	0.0253
1203	7	0.07	0.0356
14(01-03)	5	0.05	0.0253
15(01-03,05)	7	0.07	0.0356
1504	2	0.02	0.0101
blank	14	0.14	0.0726

Table 4 Significant HLA-A and -B association in NE-Thais.

HLA-A*	HLA-B*	n	Delta[@]
0207	4601	19	796
24	27	7	214
33	5801	7	316
30	13	4	174
33	4801	3	141
33	44	3	115
29	07(02-05)	3	144

@ = delta x 10000

Table 5 Significant HLA-B and -C association in NE-Thais

HLA-B*	HLA-Cw*	n	Delta@
07(02-05)	07(01-03)	8	305
13	0304	8	320
13	0602	4	174
15(02,08,11,15)	08	14	645
15(01,04-07,12,19,20)	0304	4	137
15(01,04-07,12,19,20)	04	6	232
18	0704	8	370
27	0304	5	193
35	04	11	453
38	07(01-03)	7	264
39/6701	07(01-03)	7	285
4001	0304	6	232
40(02,04-06)	15(01-03)	4	192
44	07(01-03)	7	285
4601	01	26	1135
51/5201	14	6	292
5401	01	4	164
55/56	1203	7	328
5801	0302	10	487

@ = delta x 10000

Table 6 Possible MHC class I haplotypes in 100 northeastern-Thais

HLA-A*	HLA-Cw*	HLA-B*	n
29	07(01-03)	07(02-05)	2
11	07(01-03)	07(02-05)	3
30	0602	13	4
11	0304	13	7
11	08	15(02,08,11,15)	8
24	04	15(01,04-07,12,19,20)	5
24	0704	18	7
0203	07(01-03)	18	2
24	0304	27	5
24	04	35	6
11	07(01-03)	38	3
24	07(01-03)	38	5
0203	07(01-03)	39/6701	6
11	0304	4001	5
24	04	4001	3
11	15(01-03,05)	40(02,04-06)	2
33	07(01-03)	44	3
0207	01	4601	19
11	01	4601	6
11	14	51/5201	3
24	01	5401	2
33	0302	5801	7