บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ฮิวแมนนิวโทรฟิลแอนติเจน (human neutrophil antigen: HNA) เป็นแอนติเจนที่อยู่บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล และสามารถพบได้เล็กน้อยบนผิวเซลล์แกรนูลโลไซต์ (granulocyte) อื่น ๆ ได้แก่ เบโซฟิล (basophil) และอิโอซิโนฟิล (eosinophil) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA เกิดจากการมีภาวะต่อเนื่องจากกลุ่มอาการ rheumatoid arthritis (RA) และ systemic lupus erythrematosus (SLE) หรือการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial infection) ในร่างกาย ทำให้เกิดภาวะ autoimmune neutropenia ได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ นอกจากนี้ ยังอาจเกิดจากการถูกกระตุ้นภายหลังการรับเลือด (post transfusion) หรือปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจน HNA ไม่ตรงกัน (HNA incompatible) ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเกิดการตอบสนองและสร้างแอนติบอดีในกลุ่ม alloimmune antibody ขึ้นมา ก่อให้เกิดภาวะ 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) การคัดเลือกผู้บริจาคที่ไม่มีแอนติเจนของเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลตรงกับแอนติบอดีที่ผู้ป่วยมีจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นที่สุดเพื่อป้องกันการเกิดภาวะดังกล่าว

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) แต่ละระบบแบ่งออกเป็นหมู่ย่อย 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 ในประชากรชาวเอเชียน (asians) และคอเคเชียน (caucasian) พบว่าในประชากรชาวเอเชียนจะพบความถี่ของแอนติเจน HNA-1a สูงกว่า HNA-1b ตรงข้ามกับชาวคอเคเชียนที่พบ 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 ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะและมีราคาแพง 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 เทคโนโลยีของการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยอาศัยไพรเมอร์ (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