บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

การตรวจหาแอนติเจนของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลของมนุษย์ (human neutrophil antigen: HNA) สามารถตรวจได้ทั้งทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) และทางโมเลกุล (molecular) แต่การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยานั้นมีข้อจำกัดอยู่ที่แอนติซีรัมที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนของ neutrophil นั้นมีอยู่น้อย และปริมาณนิวโทรฟิลของผู้ป่วยที่ใช้ในการตรวจในภาวะนั้นก็มีจำนวนน้อย อีกทั้งการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยานั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนทัยป์ (genotype) ที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) ออกจากชนิดที่เป็นเฮตเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ ดังนั้นการตรวจหายีนของนิวโทรฟิลโดยวิธีทางโมเลกุลจึงช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ 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 ทำให้สามารถตรวจหายีนของแอนติเจนของเม็ดเลือดขาว neutrophil ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งการตรวจโดยวิธีนี้ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมต่อความคุ้มทุนในการตรวจแต่ละครั้ง ทำให้สามารถทำการตรวจได้ทันทีถึงแม้ว่าจะมีจำนวนตัวอย่างเพียงรายเดียวก็ตาม

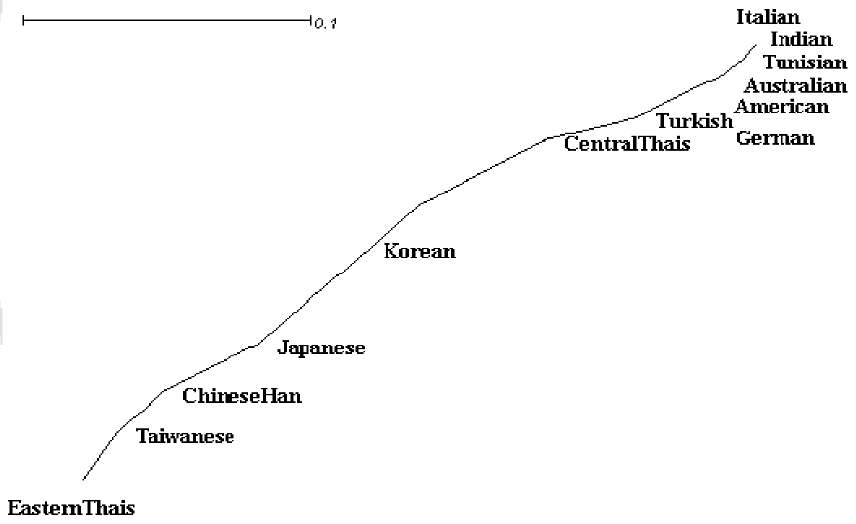
คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจหา HNA-1 ตามวิธีของ Han TH และคณะโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบชนิด HNA-1 (Han TH *et al.* 2006) แม้ว่าวิธีดังกล่าวจะสามารถนำมาใช้ตรวจหาได้ทั้ง HNA-1aa และ -1ab แต่พบว่าแถบของผลผลิตที่เกิดขึ้น (PCR product) ยังไม่คมชัดเท่าที่ควร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ปรับเปลี่ยนภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง 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 จึงทำให้เห็นแถบของยีนที่ปรากฏได้ชัดเจนขึ้น การเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำการทดลองระหว่างวิธีของ Han TH และคณะและวิธีที่ปรับปรุงขึ้นดังแสดงในตารางที่ 5.1 นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ลดเวลาในขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา PCR ในช่วงแรกจาก 95 ^{o}C นาน 30 นาที ให้เหลือเพียง 5 นาที ทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจหายีน HNA-1 โดยวิธีที่ปรับปรุงขึ้นมานี้รวดเร็วขึ้นกว่าการทดลองตามวิธีของ 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	(μM/reaction)	0.1	0.1
Allele-specific primer	(μM/reaction)	0.4	0.4
$MgCl_2$	(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 ในตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดประจำที่มีเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ทางภาคตะวันออกของไทย (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 เมื่อคำนวณหาค่าความถี่ของอัลลีล (allele frequency) พบความถี่ของ HNA-1a เท่ากับ 0.722 ซึ่งมากเป็น 2.6 เท่าของ HNA-1b (0.274) สำหรับแอนติเจน HNA-1c นั้น พบเพียง 0.009 ส่วนใหญ่จะไม่มีการแสดงออกของแอนติเจน HNA-1c (HNA-1c negative) (0.991) เมื่อเปรียบเทียบค่าความถี่ของการกระจายตัวของ HNA-1 ที่ตรวจพบในกลุ่มตัวอย่างเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกของไทย (Eastern Thais) ซึ่งเป็นผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลระยองกับความถี่ที่พบในชาวไทย ซึ่งเป็นผู้บริจาคเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย หรือที่เรียกว่า ชาวไทยภาคกลาง (Central Thais) ซึ่งส่วนใหญ่มีเชื้อชาติผสมระหว่างชาวไทยกับชาวจีน และชาวไทยกับเชื้อชาติอื่น ๆ (Romphruk AV *et al.* 1999; Kupatawintu P *et al.* 2010; Changsri K *et al.* 2014) ผลการวิเคราะห์พบว่าการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ของผู้บริจาคเลือดที่มีเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกของไทยมีความแตกต่างกับความถี่ที่พบในประชากรชาวไทยภาคกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value <0.05) เช่นเดียวกับที่พบความแตกต่างในชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในแถบภูมิภาคเอเชีย (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) ซึ่งพบความถี่ของแอนติเจน 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 และภาคตะวันออกฉียงเหนือที่มีความคล้ายคลึงกับประชากรชาวจีนที่อาศัยอยู่ทางใต้ของประเทศ (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 ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้ที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกมีความใกล้ชิดกับประชากรชาวเอเชียน (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 ซึ่งตรงกันข้ามกับรายงานการศึกษาในประชากรชาวอาเจนติเนียน (Argentinean) ที่ชี้ให้เห็นว่าไม่มีโอกาสตรวจพบ HNA-1c ในกลุ่มตัวอย่างที่มีจีโนทัยป์ HNA-1aa (de La Vega Elena CD *et al.* 2008) อย่างไรก็ตาม เคยมีรายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่า การแสดงออกร่วมกันของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c นั้นสามารถพบได้ในบุคคลที่มียีน *FcγRIIIB* ทั้ง 3 อัลลีล (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 นั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กับ 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 ในประชากรชาวไทยแท้น่าจะมีสาเหตุจาก anti-HNA-1a เช่นเดียวกับในชาวจีน และประชากรในกลุ่ม Asians (Chinese Han, Taiwanese, Korean และ Japanese) ซึ่งมีการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 ใกล้เคียงกัน แต่มีโอกาสตรวจพบได้น้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัด

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

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY
華僑崇聖大學

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
華僑崇聖大學
HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY

ตารางที่ 5.2 ความถี่ของแอนติเจน HNA-1a, -1b และ -1c ในประชากรเชื้อชาติไทยแท้กับประชากรเชื้อชาติต่าง 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)
HNA-1a	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
HNA-1b	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
HNA-1c	0.009	0.005	0.000	0.000	NT	0.000	0.000	0.030	0.030	0.000	0.000	0.025	NT
HNA-1null	0.004												
Reference	This study	(Changsri K *et al.* 2014)	(Xia W *et al.* 2011)	(Tsuno H *et al.* 2011)	(Han TH *et al.* 2006)	(Tsuno H *et al.* 2011)	(Xia W *et al.* 2011)	(Hauck B *et al.* 2011)	(Xia W *et al.* 2011)	(Abid S *et al.* 2001)	(Xia W *et al.* 2011)	(Flesch BK *et al.* 2002; Xia W *et al.* 2011)	(Xia W *et al.* 2011)