บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เกล็ดเลือดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือด การให้เกล็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือด (Human Platelet Antigen : HPA) ไม่ตรงกันระหว่างผู้ป่วยและผู้บริจาคจะทำให้ผู้ป่วยสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนที่ไม่ตรงกันและมีการทำลายเกล็ดเลือดที่ให้เข้าไป ทำให้จำนวนเกล็ดเลือดไม่เพิ่มขึ้นตามจำนวนที่คาดหวัง เกิดภาวะที่เรียกว่า platelet transfusion refractoriness (PTR) หรือทำให้เกิดจ้ำเลือดตามร่างกายภายหลังการรับเกล็ดเลือด (Post-Transfusion Purpura : PTP) นอกจากนี้แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดยังทำให้ทารกเสียชีวิตหลังคลอดเนื่องจากเกิดภาวะ neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura (NAITP) ได้ด้วย (Kunicki TJ and Newman PJ. 1992; Teler VV. 1999) การคัดเลือกหาเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจนที่ตรงกันให้แก่ผู้ป่วยที่มีภาวะดังกล่าวอย่างเร่งด่วนจึงจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อช่วยรักษาผู้ป่วยเหล่านี้ ในปัจจุบันแอนติเจนของเกล็ดเลือดนั้นมีทั้งหมด 16 ระบบ (Metcalft P, Watkins NA, Ouwehand WH *et al.* 2003) แต่ละระบบจะมีแอนติเจน 2 ชนิดคือ a และ b โดยอาศัยความแตกต่างกันของลำดับเบสเพียงหนึ่งตำแหน่ง ทำให้สามารถแยกแอนติเจนทั้งสองออกจากกันได้ แต่เดิมวิธีการทดสอบที่ใช้ตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดจะใช้การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (Bettaieb A, Fromont P, Rodet M *et al.* 1991) แต่มีข้อจำกัดอยู่ 3 ประการคือ ปริมาณของเกล็ดเลือดของผู้ป่วยที่จะนำมาใช้ในการตรวจมีน้อยจึงไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการตรวจนอกจากนี้ ห้องปฏิบัติการที่มีแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อการตรวจมีอยู่เพียงไม่กี่แห่งและแอนติซีรัมที่จะใช้ตรวจหาแอนติเจนชนิดใหม่ๆ ก็ไม่มี อีกทั้งการตรวจทางน้ำเหลืองนั้นไม่สามารถแยก homozygous ออกจาก heterozygous ได้ด้วย ดังนั้นจึงได้มีการนำวิธีการตรวจทางโมเลกุลมาใช้เพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าว แต่การตรวจโดยวิธีนี้สามารถใช้เทคนิคการตรวจได้หลายเทคนิค เช่น polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) (Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y *et al.* 1981) polymerase chain reaction with allele specific oligonucleotide (PCR-ASO) hybridization (Mc Farland JG, Aster RH, Bussel JB *et al.* 1991) และ polymerase chain reaction with sequence specific primer (PCR-SSP) (Metcalfe P and Waters AH. 1993) เป็นต้น ในประเทศไทย ความรู้เกี่ยวกับแอนติเจนของเกล็ดเลือดยังไม่แพร่หลาย การให้เกล็ดเลือดแก่ผู้ป่วยยังใช้วิธีการคัดเลือกจากผู้บริจาคที่มีแอนติเจนของหมู่เลือดระบบ ABO ที่ตรงกันเท่านั้นให้แก่ผู้ป่วย จึงทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสที่จะสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดมากขึ้น เคยมีรายงานการวิจัยการตรวจหาแอนติเจนของเกล็ดเลือด

อยู่ 4 ฉบับ ซึ่งทำการศึกษาโดยวิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา 2 ฉบับ โดยใช้เทคนิค mixed passive hemagglutination (MPHA) (O' charoen R, Kupatawintu P and Jitjak N 1993; Urwijitaroon Y, Barusrux S, Romphruk A *et al.* 1995) และวิธีทางโมเลกุลวิทยา 2 ฉบับ (Romphruk AV, Akahat J, Srivanichrak P *et al.* 2000; Kongmaroeng C, Tardtong P, Mongkolsuk T *et al.* A 2545) โดยใช้วิธี PCR-SSP มาตรวจหาความถี่ของยีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในระบบที่1 ถึง 6 (HPA-1 to- 6) จากรายงานวิจัยของ Romphruk และคณะ ซึ่งได้ทำการทดสอบในผู้บริจาคโลหิตไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 400 ราย นั้น วิธีที่ใช้ในการตรวจหายีนทั้ง 6 ระบบในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองแต่ละระบบต้องใช้อุณหภูมิต่างกัน จึงต้องเพิ่มขั้นตอนการตรวจและใช้เวลาตรวจนาน แต่ในงานวิจัยของ Kongmaroeng และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาความถี่ของยีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดระบบที่ 1 ถึง 6 ในประชากรไทยภาคกลางโดยใช้เทคนิค PCR-SSP เช่นเดียวกัน แต่การตรวจหายีนของทั้ง 6 ระบบสามารถทำได้พร้อมกันทำให้สามารถทำการตรวจได้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังมียีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดอีกหลายระบบที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา และเนื่องจากผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะดังที่กล่าวมาแล้วนั้นจำเป็นที่จะต้องได้รับเกล็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจนที่ตรงกันให้มากที่สุด เพื่อให้การรักษาเป็นไปในทางที่ดีและไม่ก่อให้เกิดปัญหาภาวะไม่พึงประสงค์หลังการรับเกล็ดเลือด ดังนั้น การคัดเลือกหาชนิดของเกล็ดเลือดที่ถูกต้องและครบถ้วนในเวลารวดเร็ว ด้วยวิธีการตรวจที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการปฏิบัติงานของแต่ละห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นอย่างยิ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาจีโนทัยป์ของ HPA-7 ถึง 13 โดยวิธี PCR-SSP

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทำการทดลองหาอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบและความเข้มข้นของ mastermix เพื่อใช้ในการทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง และหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการถ่ายภาพเพื่อตรวจหาผลผลิตที่เกิดขึ้น โดยใช้ตัวอย่างเลือดผู้บริจาคเลือดประจำของโรงพยาบาลรามาธิบดีที่ได้รับการตรวจหาชนิดของ HPA-1 ถึง 6 แล้ว ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกและติดตามผู้บริจาคเกล็ดเลือดให้แก่ผู้ป่วยที่เหมาะสมต่อไป

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย

1. กำหนดจำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่ทำให้งานวิจัยน่าเชื่อถือ โดยทางสถิติกำหนดให้จำนวนตัวอย่างนั้นมากกว่า 30 ราย
2. ดีเอ็นเออ้างอิงที่ใช้ในการวิจัยนี้ เนื่องจากไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอที่มียีนที่จำเพาะต่อทั้ง 2 อัลลีน จึงใช้ความจำเพาะของ primer ตำแหน่งของ DNA marker และการทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันความถูกต้องของผลการตรวจพบอัลลีนที่ไม่มีดีเอ็นเออ้างอิง

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

HPA	=	Human Platelet Antigen
PCR-SSP	=	Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer
NAITP	=	Neonatal Alloimmunization Thrombocytopenic Purpura
PTP	=	Post-Transfusion Purpura
PTR	=	Platelet Transfusion Refractoriness

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำเทคนิคการตรวจหา HPA-7 ถึง 13 โดยวิธี PCR-SSP นี้ไปใช้ในงานประจำวันได้
2. สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาความถี่ของยีน HPA-7 ถึง 13 ในประชากรไทยได้
3. สามารถนำไปใช้ในการตรวจและคัดกรองผู้บริจาคเกล็ดเลือดที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วยที่มีภาวะ NAITP, PTP และ PTR ได้

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學