บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แอนติเจนของเกล็ดเลือด (Human platelet antigen)

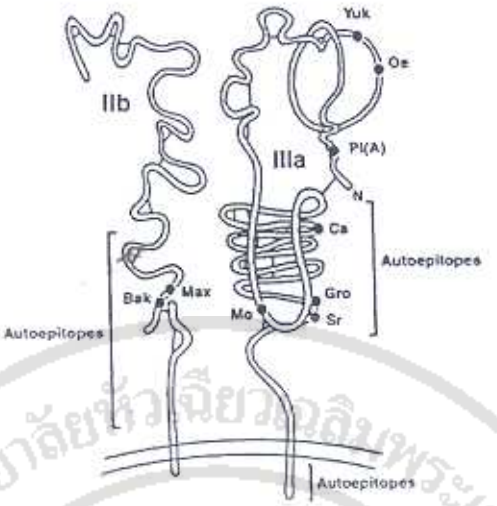
แอนติเจนที่ปรากฏอยู่บนผิวของเกล็ดเลือดแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ แอนติเจนที่มีและไม่มีความจำเพาะต่อเกล็ดเลือด แอนติเจนทั้ง 2 ประเภทประกอบด้วย

2.1.1 แอนติเจนที่ไม่จำเพาะต่อเกล็ดเลือด (platelet non-specific alloantigens)

แอนติเจนในกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั้งบนผิวเซลล์ของเกล็ดเลือดและเซลล์ชนิดอื่นๆ ตัวอย่างของแอนติเจนในกลุ่มนี้ ได้แก่ แอนติเจนของเม็ดเลือดแดงในระบบ ABO, Lewis, Ii, P และ Cr และแอนติเจนของเม็ดเลือดขาว ได้แก่ HLA class I เป็นต้น (Van dem Borne AEGKR, de Haas M, Simcek S *et al.* 1996) ในการให้เกล็ดเลือดแก่ผู้ป่วยนั้น พบว่าในกรณีที่มีการให้เกล็ดเลือดที่มีหมู่เลือดระบบ ABO ไม่ตรงกันแก่ผู้ป่วย โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีระดับของ anti-A และ anti-B ในร่างกายสูง แอนติบอดีนั้นสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับแอนติเจน A และ B ที่มีอยู่บนผิวของเกล็ดเลือดและทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะที่ไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด ที่เรียกว่า platelet refractoriness แต่ยังไม่มีรายงานอุบัติการณ์ของการทำลายเกล็ดเลือดที่มีสาเหตุมาจากหมู่เลือดในระบบอื่นๆ ที่พบอยู่บนผิวของเกล็ดเลือด ในทางตรงข้าม กลับมีรายงานถึงความสัมพันธ์ของแอนติเจนของเม็ดเลือดขาวต่อการเกิดภาวะ platelet refractoriness สูงกว่า ซึ่งส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นกับผู้หญิงที่มีการตั้งครรภ์หลายครั้ง (multiparous woman)

2.1.2 แอนติเจนที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือด (platelet specific alloantigens)

แอนติเจนเหล่านี้ จะพบอยู่บริเวณที่เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein : GP) ของผิวเซลล์ของเกล็ดเลือด ดังแสดงในรูปภาพที่ 1 ซึ่งส่วนใหญ่พบอยู่บนส่วนของ GP Ia, GPIb, GPIIb และ GPIIIa แอนติเจนที่พบอยู่บริเวณนี้สามารถชักนำให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนของบุคคลอื่น (alloantibody) ได้ด้วย (Kunicki TJ. 1988; Nurden AT. 1995) นอกจากนี้ จากรายงานของ Tomiyama และคณะ (Tomiyama Y, Take H, Ikeda H *et al.* 1990) ยังพบว่ามีแอนติเจนที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือดที่ชื่อว่า "Nak^{a}" อยู่บนส่วนของ GPIV ด้วย



รูปภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่อยู่บนGPIIb/IIIa complex

จากรูป จุดที่แสดงให้เห็นเป็นตำแหน่งที่อยู่ของแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่มีชื่อดังแสดง

ที่มา: Teler VV. (1999).Technical manual. 13th ed. Besthada: American Association of blood bank:342.

2.2 การเรียกชื่อของแอนติเจนที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือด (The nomenclature of platelet specific alloantigen)

แต่เดิม การเรียกชื่อแอนติเจนของเกล็ดเลือดจะเรียกตามชื่อของผู้ป่วยที่เป็นเจ้าของซีรัมที่พบแอนติบอดีต่อแอนติเจนนั้น ต่อมา มีการรายงานการค้นพบแอนติเจนต่างๆ จำนวนมากขึ้น และแอนติเจนที่พบนั้น บางชนิดก็เป็นแอนติเจนเดียวกัน แต่ใช้วิธีการตรวจแตกต่างกัน ทำให้เกิดการซ้ำซ้อนในการเรียกชื่อ (Newman PJ. 1994) ดังนั้น เพื่อไม่ให้เกิดการซ้ำซ้อนในการเรียกชื่อ ในปี 1990 คณะกรรมการของ International Committee for Standardization in Haematology (ICSH) and the International Society of Blood Transfusion (ISBT) จึงได้กำหนดกฎของการเรียกชื่อแอนติเจนของเกล็ดเลือดขึ้นมา ดังนี้

1. กำหนดให้เรียกแอนติเจนที่จำเพาะต่อเกล็ดเลือดว่า "Human Platelet Alloantigen (HPA)"
2. ระบบของแอนติเจนต่างกันๆ จะถูกกำหนดโดยใช้<u>ตัวเลข</u>เรียงตามลำดับของวันที่นำเสนอ
3. อัลลีนของแอนติเจนระบบต่างๆ จะใช้ <u>ตัวอักษร</u> (a /b) เป็นตัวกำหนดตามความถี่ของอัลลีนที่ตรวจพบจากมากไปน้อย

4. แอนติเจนที่จะได้รับการยอมรับให้เป็นระบบใหม่ต้องผ่านการประชุมของ ICSH/ISBT ก่อน

ต่อมา เมื่อมีการนำวิธีการตรวจทางโมเลกุลวิทยามาใช้ทำให้มีการค้นพบแอนติเจนในระบบใหม่ๆ เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการกำหนดให้แอนติเจนที่เพิ่งค้นพบใหม่ ให้กำหนดตัวอักษร "w" ไว้ก่อน จนกว่าจะพิสูจน์ได้ว่าเป็นแอนติเจนชนิดใหม่และไม่ใช่แอนติเจนที่พบเฉพาะในชนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเท่านั้น (private antigen) จึงจะกำหนดระบบของแอนติเจนของเกล็ดเลือด "HPA" ให้ (Van dem Borne AEGKR, de Haas M, Simcek S *et al.* 1996)

ปัจจุบันจึงมีการจัดแบ่งแอนติเจนของเกล็ดเลือดออกเป็น 16 ระบบ (Metcalft P, Watkins NA, Ouwehand WH *et al.* 2003) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่า อัลลีน a และ b นั้นจะมีลำดับของเบสที่แตกต่างกันเพียง 1 เบส ทำให้สามารถใช้ในการแยกความจำเพาะของอัลลีนของแต่ละระบบได้

ตารางที่1 แสดงชนิดของ Human platelet antigen (HPA) แต่ละระบบ (Metcalft P, Watkins NA, Ouwehand WH *et al.* 2003)

System	Antigen	Alternative names	Glycoprotein	Nucleotide change	Amino acid	Molecular name
HPA-1	HPA-1a	Zw^a, Pl^{A1}	GPIII a	T^{196}	Leu^{33}	GPIII a-Leu33
	HPA-1b	Zw^b, Pl^{A2}		C^{196}	Pro^{33}	GPIII a-Pro33
HPA-2	HPA-2a	Ko^b	GPI b_α	T^{524}	Thr^{145}	GPI b-Thr145
	HPA-2b	Ko^a, Sib^a		C^{524}	Met^{145}	GPI b-Met145
HPA-3	HPA-3a	Bak^a, Lek^a	GPII b	T^{2622}	Ile^{843}	GPII b-Ile843
	HPA-3b	Bak^b		G^{2622}	Ser^{843}	GPII b-Ser843
HPA-4	HPA-4a	Yuk^b, Pen^a	GPIII a	A^{526}	Arg^{143}	GPIII a-Arg143
	HPA-4b	Yuk^a, Pen^b		G^{526}	Gln^{143}	GPIII a-Gln143
HPA-5	HPA-5a	Br^b, Zav^b	GPI a	G^{1648}	Glu^{505}	GPI a-Glu505
	HPA-5b	Br^a,Zav^a,Hc^a		A^{1648}	Lys^{505}	GPI a-Lys505
HPA-6w	HPA-6a	Ca^b, Tu^b	GPIII a	G^{1564}	Arg^{489}	GPIII a-Arg489
	HPA-6b	Ca^a, Tu^a		C^{1564}	Gln^{489}	GPIII a-Gln489

ตารางที่1 แสดงชนิดของ Human platelet antigen (HPA) แต่ละระบบ (ต่อ)

System	Antigen	Alternative names	Glycoprotein	Nucleotide change	Amino acid	Molecular name
HPA-7w	HPA-7a	Mo^{b}	GPIII a	C^{1317}	Pro^{407}	GPIII a-Pro407
	HPA-7b	Mo^{a}		G^{1317}	Ala^{407}	GPIII a-Ala407
HPA-8w	HPA-8a	Sr^{b}	GPIII a	T^{2004}	Arg^{636}	GPIII a-Arg636
	HPA-8b	Sr^{a}		C^{2004}	Cys^{636}	GPIII a-Cys636
HPA-9w	HPA-9a	Max^{b}	GPII b	G^{2603}	Val^{837}	GPII b-Val837
	HPA-9b	Max^{a}		A^{2603}	Met^{837}	GPII b-Met837
HPA-10w	HPA-10a	La^{b}	GPIII a	G^{281}	Arg^{62}	GPIII a-Arg62
	HPA-10b	La^{a}		A^{281}	Gln^{62}	GPIII a-Gln62
HPA-11w	HPA-11bw	Gro^{a}	GPIII a	A^{1996}	His^{633}	GPIII a-His633
				G^{1996}	Arg^{633}	(GPIII a-Arg633)
HPA-12w	HPA-12bw	Iy^{a}	GPIbβ/ IX	A^{141}	Glu^{15}	GPI b-Glu15
				G^{141}	Gly^{15}	GPI b-Gly15
HPA-13w	HPA-13bw	Sit^{a}	GPIa	T^{2531}	Met^{799}	GPIa-Met799
				C^{2531}	Thr^{799}	GPIa-Thr799
HPA-14w	HPA-14bw	Oc^{a}	GPIIIa	1909_1911 del AAG	K611del	K611del
HPA-15	HPA-15a	Gov^{b}	CD109	C^{2108}	Tyr^{703}	CD109-Tyr703
	HPA-15b	Gov^{a}		A^{2108}	Ser^{703}	CD109-Ser703
HPA-16w	HPA-16bw	Duv^{a}	GPIIIa	C^{517}	Thr^{140}	GPIIIa-Thr140
				T^{517}	Ile^{140}	GPIIIa-Ile140

ยีน HPA-7 (Mo)

แอนติเจนของระบบนี้ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1993 โดย Kuijpers RWAM และคณะ. พบว่ายีนนี้เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดภาวะ NAITP (Kuijpers RWAM, Simsek S, Faber NM *et al.* 1993) แอนติเจนของยีนในระบบนี้ เกิดจากการแทนที่กันระหว่าง cytosine กับ guanine บริเวณเบสลำดับที่ 1317 ของยีนที่ encode อยู่บน GPIIIa ทำให้ proline เปลี่ยนไปเป็น alanine โดยพบว่า

ถ้ากรดอะมิโนที่อยู่ในตำแหน่งที่ 407 เป็น proline แอนติเจนนั้นจะเป็น HPA-7a แต่ถ้าเป็น alanine แอนติเจนนั้นจะเป็น HPA-7b

ยีน HPA-8 (Sr)

จากรายงานของ Kroll H และคณะ (Kroll H, Kiefel V, Santoso S *et al.* 1990) พบว่า HLA-8b แม้ว่าจะถูกจัดเป็น private antigen แต่ก็สามารถทำให้เกิด NAITP ได้เช่นกัน และต่อมา Santoso S และคณะ พบว่าแอนติเจนระบบนี้เกิดจากการแทนที่กันระหว่าง cytosine กับ thymine บริเวณเบสลำดับที่ 2004 ของยีนที่ encode อยู่บน GPIIIa (Santoao S, Kalb R, Kroll H *et al.* 1994)

ยีน HPA-9 (Max)

แอนติเจนระบบนี้มีการรายงานครั้งแรกโดย Noris P และคณะ (Noris P, Simsek S, de Bruijne-Admiraal LG *et al.* 1995) พบว่าเกิดจากการแทนที่กันของเบสที่อยู่ในลำดับที่ 2603 ระหว่าง guanine กับ adenine ของยีนที่อยู่บน GPIIb มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตัวที่ 837 จาก valine เป็น methionine โดยพบว่า ถ้ากรดอะมิโนตรงตำแหน่งนั้นเป็น valine แอนติเจนนั้นจะเป็น HPA-9a แต่ถ้าเป็น methionine แอนติเจนนั้นจะเป็น HPA-9b

ยีน HPA-10 (La)

จากรายงานของ Peyruchaud O และคณะ (Peyruchaud O, Bourre F, Morel-Kopp MC *et al.* 1997) พบว่า แอนติเจน HPA-10b เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบสในตำแหน่งที่ 281 ของยีนที่อยู่บน GPIIIa เปลี่ยนจาก guanine ไปเป็น adenine ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 62 จาก arginine ไปเป็น glutamine โดยพบว่า ถ้ากรดอะมิโนตรงตำแหน่งนั้นเป็น arginine แอนติเจนนั้นจะเป็น HPA-10a แต่ถ้าเป็น glutamine แอนติเจนนั้นจะเป็น HPA-10b

ยีน HPA-11 (Gro)

แอนติเจนในระบบนี้มีรายงานครั้งแรกในปี 1994 โดย Simsek S และคณะ (Simsek S, Goldschmeding R, Kuijpers RWAM *et al.* 1994) พบว่าแอนติเจนระบบนี้อยู่บน GPIIa (β3) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ GPIIb/IIIa complex และเรียกชื่อแอนติเจนนี้ว่า Gro ต่อมา ในปี 1997 คณะผู้วิจัย พบว่า แอนติเจนระบบนี้เกิดจากการแทนที่กันของเบสในลำดับ 1996 ระหว่าง guanine กับ adenine และยีน Gro^a นั้นจะอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กับตำแหน่งของ HPA-8b (Sr^a) (Simsek S, Folman C, van der Schoot CE *et al.* 1997)

ยีน HPA-12 (Iy)

จากรายงานของ Santoso S และคณะ พบว่า แอนติเจนระบบนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะ NAITP (Santoso S, Bohringer M, Sachs U *et al.* 1996) โดยแอนติเจนของระบบนี้จะอยู่บน GPIb/IX complex และเกิดจากการแทนที่ของเบสในลำดับที่ 141 จาก adenine เป็น guanine ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 15 เปลี่ยนจาก glutamic acid ไปเป็น glycine

ยีน HPA-13 (Sit)

จากรายงานของ Santoso S และคณะ ในปี 1997 (Santoso S, Amrhein I, Sachs U *et al.* 1997) พบว่าแอนติเจนในระบบนี้จัดเป็น "low incidence antigen" ของประชากรเยอรมัน และพบว่าแอนติเจนนี้อยู่บน GPIa เกิดจากการแทนที่ของเบสในลำดับที่ 2531 จาก thymine เป็น cytosine ทำให้กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 799 เปลี่ยนจาก methionine ไปเป็น threonine

ตารางที่ 2 แสดงความถี่ของการตรวจพบยีนของเกล็ดเลือดระบบที่ 7 ถึง 13 ที่รายงานในประเทศต่างๆ

ที่มา :EBI supporting. (2005) IPD-HPA sequence database. (Online). Available:EBI supporting, 2005; http:// www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freqs_1.html. (16 June 2005)

Country	Method	HPA-7a	HPA-7b	HPA-8a	HPA-8b	HPA-9a	HPA-9b	HPA-10a	HPA-10b	HPA-11a	HPA-11b	HPA-12a	HPA-12b	HPA-13a	HPA-13b
Austria	PCR-RFLP							1		1					
Brazil	PCR-RFLP/SSP					1	0								
French Polynesia	PCR-RFLP and SSP	1				1									
Germany	PCR-SSP					0.997	0.003								
Taiwan	PCR-SSP	1	0	1	0	1	0	0.9983	0.0017	1	0	1	0	1	0
USA	Allele-specific PCR					0.998	0.002								
Vietnam	PCR-RFLP and SSP	1				1		1		1					

2.3 ภาวะทางคลินิกที่มีสาเหตุมาจากแอนติบอดีของเกล็ดเลือด (Clinical condition caused by immunization of HPA)

ภาวะที่มีการทำลายเกล็ดเลือดที่ให้เข้าไป และ/หรือภาวะที่เกล็ดเลือดในร่างกายถูกทำลาย เนื่องจากการมีแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนของเกล็ดเลือด แบ่งออกเป็น 3 ภาวะ ได้แก่

2.3.1 **ภาวะ neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura (NAITP)**

เป็นภาวะของการทำลายเกล็ดเลือดของเด็กแรกคลอด ซึ่งมีกลไกของการทำลายที่คล้ายกับการทำลายเม็ดเลือดแดงในภาวะ hemolytic disease of the newborn (HDN) โดยมีผลมาจากแอนติบอดีของแม่ที่ผ่านรกเข้าเป็นแอนติบอดีที่จำเพาะกับแอนติเจนที่อยู่บนเกล็ดเลือดของทารก ทำให้เกิดการทำลายเกล็ดเลือดและทำให้ทารกเกิดภาวะ thrombocytopenia ตั้งแต่แรกคลอดและเสียชีวิตในที่สุด อุบัติการณ์ของการเกิดภาวะนี้ในเด็กแรกคลอดพบเพียง 1 ใน 20,000 -30,000 ราย (Harrington WJ, Sprague CC and Minnich V, 1953; Mc Farland JG, Aster RH, Bussel JB *et al.* 1991) ถึงแม้ว่าจะมีอุบัติการณ์ต่ำ แต่อาการที่เกิดขึ้นนั้นจะรุนแรงจนกระทั่งเสียชีวิต และจากการศึกษาของ Dovaren และคณะ (Dovaren A, Mc Parland P, Barnes CA *et al.* 2002) พบว่าในประชากรของ Irish มีอัตราการเกิดภาวะ NAITP เพียง 1 ใน 1000-2000 เด็กที่คลอดมีชีวิต

2.3.2 **ภาวะมีจ้ำเลือดภายหลังการรับเลือด (Post-transfusion purpura:PTP)**

เป็นภาวะที่มีการทำลายเกล็ดเลือดที่ให้เข้าไป ทำให้ผู้ป่วยมีภาวะ thrombocytopenia อยู่นานประมาณ 1 สัปดาห์ อย่างไรก็ตาม ภาวะนี้สามารถสังเกตพบได้ภายหลังจากการให้เลือดที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเกล็ดเลือดของผู้ป่วยเข้าไป (Aster RH. 1989) อันตรายที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะนี้เกิดจากการมีเลือดออกไม่หยุด เนื่องจากผู้ป่วยมีจำนวนของเกล็ดเลือดต่ำ พบว่าส่วนใหญ่ผู้ที่อยู่ในภาวะนี้จะมีปริมาณของเกล็ดเลือดน้อยกว่า 20,000/µl และพบมากในหญิงที่ตั้งครรภ์มาแล้วหลายครั้งและเคยได้รับการกระตุ้นเกล็ดเลือดมาก่อน รวมทั้งยังพบภาวะนี้ในผู้ป่วยทั้งหญิงและชายที่เคยได้รับเลือดมาบ่อยครั้ง โดยส่วนใหญ่ภาวะ PTP นี้จะมีความสัมพันธ์กับแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่อยู่บนผิว GP IIb/IIIa complex ซึ่งเป็นที่อยู่ของ HPA-1, HPA-3 และ HPA-4 พบว่า ร้อยละ 90 ของผู้ป่วยในภาวะนี้มักเกิดจากการที่ผู้ป่วยมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนในระบบที่ 1 (HPA-1) (Mueller-Eckhardt C. 1986)

ถึงแม้ว่ายังไม่ทราบถึงอุบัติการณ์ที่แน่ชัดของการเกิดภาวะ PTP แต่จากรายงานของ Reznikaff-Etievant MF และคณะ (Reznikaff-Etievant MF, Dangu C and Lobet R. 1981) พบว่า จนถึงปี 1986 มีผู้ป่วยที่มีภาวะ PTP อยู่ถึง 150 ราย อย่างไรก็ตาม ภาวะดังกล่าวนี้ก็มีปัญหา

จากการมีแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดขาว (anti-HLA) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยพบว่า HLA-B8 และ HLA-DR3 จะมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน Zw^3 ที่พบในมารดาที่ให้กำเนิดบุตรที่มีภาวะ NAITP ดังนั้น HLA จึงอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะ PTP ขึ้นมาได้ด้วย

2.3.3 ภาวะการไม่ตอบสนองต่อเกล็ดเลือดที่ให้ (Platelet transfusion refractoriness:PTR)

พบในผู้ป่วยที่ได้รับเกล็ดเลือดปริมาณมากแต่ปริมาณเกล็ดเลือดในร่างกายของผู้ป่วยนั้นไม่มีการเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกล็ดเลือดที่ให้นั้นถูกทำลายโดยแอนติบอดีของผู้ป่วยที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวของเกล็ดเลือดของผู้ให้ ภาวะนี้พบได้ประมาณ 20-70% ของผู้ป่วยที่มีภาวะ thrombocytopenia ที่ได้รับเลือด และการพิจารณาว่าผู้ป่วยมีภาวะ PTR หรือไม่นั้น จะพิจารณาจากค่าปริมาณของเกล็ดเลือดในร่างกายผู้ป่วยหลังจากให้เกล็ดเลือดภายใน 2 สัปดาห์ ซึ่งพิจารณาจากค่าของเกล็ดเลือดที่คาดว่าจะเพิ่มขึ้นที่เรียกว่าค่า corrected platelet count increment (CCI) และ percent of predicted platelet count increment (%PPCI) (ดังแสดงในตารางที่ 3) เทียบกับค่าของเกล็ดเลือดที่พบในร่างกายของผู้ป่วย ถ้าหลังการให้เกล็ดเลือด 1 ชั่วโมง ค่า CCI น้อยกว่า 7.5 (%PPCI น้อยกว่า 15) และหลังการให้ 20-24 ชั่วโมง ค่า CCI น้อยกว่า 4.5 แสดงว่า ผู้ป่วยอยู่ในภาวะ platelet refractoriness ซึ่งต้องพิจารณาต่อไปว่า ภาวะดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากสาเหตุใด (ดังแสดงในตารางที่ 4) ถ้ามีสาเหตุมาจากผู้ป่วยมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่ให้ก็จำเป็นจะต้องหาเกล็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจนที่ตรงกันกับของผู้ป่วยให้ จากรายงานของ Moroff G. และคณะ (Moroff G, Garratty G, Heal JM *et al.* 1992) พบว่า ประมาณ 95-99% ของผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะนี้ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเม็ดเลือดขาว (anti-HLA) และเพียง 1-5% เท่านั้นที่มีสาเหตุมาจากการมีแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด (anti-HPA)

ตารางที่ 3 แสดงวิธีการคำนวณหาค่า CCI และ PPCI

ที่มา: Teler VV. AABB Technical manual: platelet and granulocyte antigens and antibodies, 13th ed. 1999, 346.

1) Calculation of Corrected Count Increment (CCI)

$$CCI = \frac{\text{platelet count increment x surface area } (m^2)}{\text{number of platelets transfused}}$$

2) Calculation of Predicted Platelet Count Increment (PPCI) and Percent Predicted Platelet Count Increment (%PPCI)

$$PPCI = \frac{\text{number of platelets transfused x } 0.67}{BV \times 1000}$$

0.67 = correction factor for splenic uptake

BV = blood volume in mL (weight in kg x 70 mL/kg)

1000 = conversion factor for mL to μL

$$\%PPCI = \frac{\text{observed platelet count increment x } 100}{PPCI}$$

HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ตารางที่ 4 แสดงสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะ platelet refractoriness

ที่มา: Teler VV. AABB Technical manual: platelet and granulocyte antigens and antibodies, 13th ed. 1999

Immune cause	Non-immune cause
ABO antibodies	Active bleeding
HLA antibodies	Fever
HPA antibodies	Sepsis
Autoantibodies	Splenomegaly (splenic sequestration)
Drug-dependent antibodies	Disseminated intravascular coagulation
	Marrow transplantation
	Age of the transfused platelets
	Poor storage of platelet prior to transfusion
	Side-effects of drugs
	Antibiotics
	Intravenous amphotericin B
	Thrombotic thrombocytopenic purpura

2.4 วิธีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของเกล็ดเลือด (Methods for platelet alloantigen determination)

การตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียในการตรวจที่แตกต่างกันออกไป การคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับความต้องการใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกวิธีที่ใช้ในการตรวจออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ วิธีการตรวจทางน้ำเหลือง (serological method) และวิธีทางโมเลกุลวิทยา (molecular method)

2.4.1 **วิธีทางน้ำเหลืองวิทยา (Serological methods)**

ที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของเกล็ดเลือดมีอยู่ 3 วิธี ได้แก่

2.4.1.1 **วิธี mixed passive heamagglutination (MPHA)**

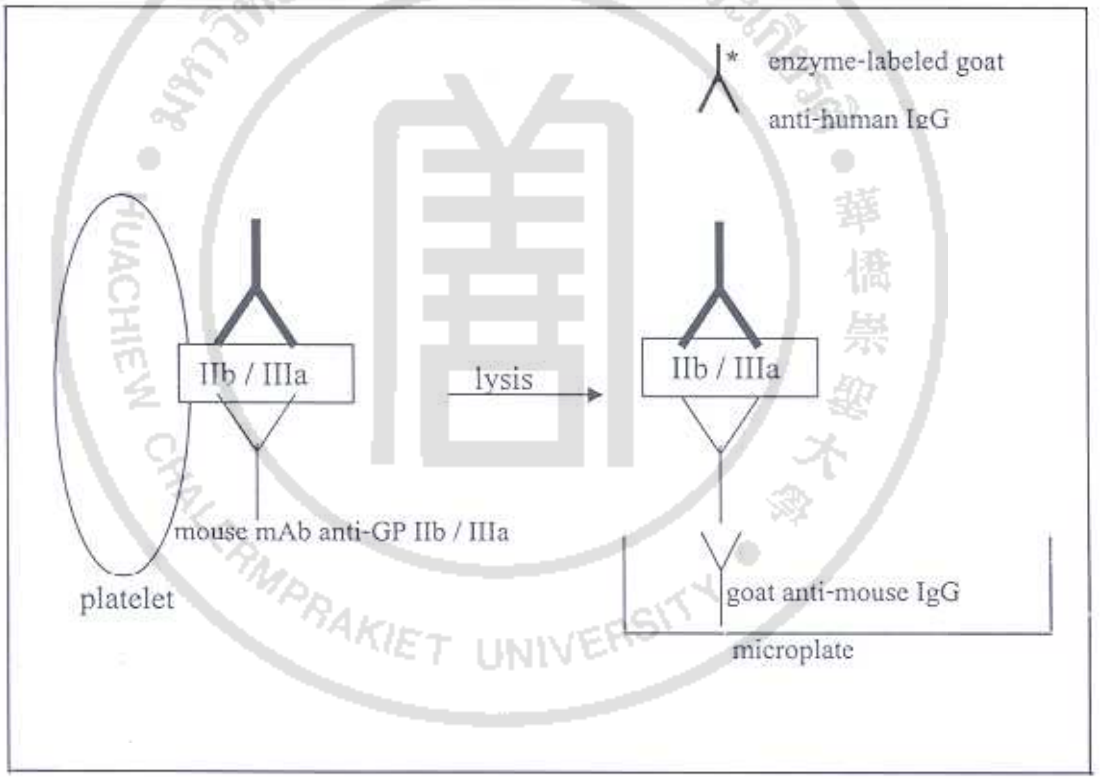
วิธีนี้ถูกพัฒนาขึ้นมาโดย Shibata Y. และคณะ (Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y *et al.* 1981) เพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีของเกล็ดเลือด คณะผู้วิจัยได้ให้ข้อเสนอแนะว่าเทคนิคนี้สามารถนำมาใช้สำหรับการตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดได้อย่างถูกต้องด้วยเช่นกัน วิธี MPHA นี้เกิดจากการนำเอาเทคนิค mixed agglutination และ reversed passive hemagglutination มารวมกัน โดยการนำเกล็ดเลือดไป fix ไว้บน microwell แล้วจึงเติมแอนติซีรัมที่ทราบชนิดของเกล็ดเลือดแล้วลงไปทำปฏิกิริยากับเกล็ดเลือด เมื่อนำไปล้างเอาแอนติบอดีส่วนเกินออก แล้วเติม anti-human IgG ลงไป ถ้าแอนติเจนและแอนติบอดีนั้นจำเพาะต่ออันจะเกิดการจับกลุ่มให้เห็นแผ่กระจายอยู่ใน microwel นั้น แต่ถ้าไม่จำเพาะกันก็จะตกตะกอนอยู่ที่ก้น microwell นั้น

ในประเทศไทย เคยมีรายงานวิจัยที่นำเอาวิธีการนี้มาใช้อยู่ 2 ฉบับ ได้แก่งานวิจัยของ O' charoen R และคณะ (O' charoen R, Kupatawintu P and Jitjak N. 1993) และงานวิจัยของ Urwijitaroon Y และคณะ (Urwijitaroon Y, Barusrux S, Romphruk A *et al.* 1995) โดยในรายงานของ O' charoen R และคณะ นั้นได้นำไปใช้ในการศึกษาหาความถี่ของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในผู้บริจาคโลหิตไทย จำนวน 132 ราย แต่ในรายงานของ Urwijitaroon Y และคณะ นั้นได้นำไปใช้ในการศึกษาความถี่ของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในผู้บริจาคโลหิตไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 48 ราย ทั้งสองรายงานให้การสนับสนุนว่าวิธี MPHA นี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดในเรื่องของแอนติซีรัมที่ใช้จะต้องมีความจำเพาะและเกล็ดเลือดและซีรัมที่นำใช้ควรจะมาจากเลือดที่เจาะเก็บมาใหม่

2.4.1.2 **วิธี monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay (MAIPA)**

Kiefel และคณะได้ปรับปรุงวิธีการนี้ขึ้นมา โดยอาศัยหลักการของ enzyme immunosorbent (EIA) มาใช้ในการตรวจ (Kiefel V. 1992) (ดังแสดงในรูปภาพที่ 2) ซึ่งจะต้อง suspend เกล็ดเลือดด้วย monoclonal antibody (MoAb) แล้วนำไป lyse ด้วย solubilization buffer เพื่อนำมาใส่ลงใน microwell ที่มี goat-antimouse IgG เกาะอยู่ แล้วเติม enzyme ที่จับอยู่กับ goat-antihuman IgG ลงไปใน microwell และใส่สับสเตรทลงไปในขั้นตอนสุดท้าย เพื่อทำการวัด activity ที่เกิดขึ้น โดยผลบวกจะเกิดสีให้เห็น

คณะผู้วิจัยดังกล่าวให้ข้อเสนอแนะว่า วิธีการนี้นอกจากจะสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีของเกล็ดเลือดแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือด (HPA typing) ได้ด้วย และยังได้รับการสนับสนุนจาก Engvall E and Perlman P (Engvall E and Perlman P. 1972) ด้วยว่า วิธีการนี้เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการคัดเลือกความเข้ากันได้ของเกล็ดเลือด เพราะสามารถตรวจได้ทั้งแอนติบอดีที่เกิดขึ้นเนื่องจาก HPA และ HLA ดังนั้นในเวลาต่อมา จึงมีผู้นิยมนำวิธีการนี้มาใช้ในการตรวจหา HPA phenotype เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลการตรวจโดยวิธีการทางโมเลกุล



รูปภาพที่ 2 แสดงหลักการตรวจโดยวิธี MAIPA

ที่มา Kiefel V 1992. The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. Transf Med. 2: 181-188.

2.4.1.3 **วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

วิธีนี้พัฒนาขึ้นโดย Engvall E และ Perlman P (Engvall E and Perlman P. 1972) โดยอาศัยหลักการของ heterogeneous EIA ทำให้สามารถตรวจหาได้ง่าย ต่อมาในปี 1999 Bessos H และคณะ (Bessos H, Hofner M, Salamat A *et al.* 1999) ได้พัฒนาวิธีการตรวจนี้มาเป็นชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการตรวจหาฟีโนทัยป์ของ HPA-1 โดยใช้เลือดครบส่วน (whole blood) เป็นตัวอย่างในการตรวจได้เลย และเป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับการตรวจในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมาก เช่น การตรวจหาฟีโนทัยป์ของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในหญิงตั้งครรภ์หรือการตรวจในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่มีอยู่จำนวนมากด้วยวิธีนี้

2.4.2 **วิธีทางโมเลกุล (Molecular methods)**

2.4.2.1 **วิธี polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)**

การตรวจโดยวิธีนี้ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกโดยคณะวิจัยของ Williamson LM (Williamson LM, Bruce D, Lubenko A *et al.* 1992) โดยอาศัยหลักการของการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ที่จำเพาะต่อยีนที่ต้องการตรวจหา และทำการวิเคราะห์ผลโดยการทำ gel electrophoresis

ต่อมาในปี 1994 Kalb R และคณะ (Kalb R, Santoso S, Unkelbach K *et al.* 1994) ได้นำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้สำหรับตรวจหายีนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 1 ถึง 5 ในขณะที่วิธีการอื่นๆ ยังไม่สามารถตรวจหายีนในระบบที่ 5 ได้

วิธีการนี้ได้รับการสนับสนุนจาก Unkelbach K และคณะ (Unkelbach K, Kalb R, Santoso S *et al.* 1995) ว่า วิธี PCR-RFLP นี้มี ความน่าเชื่อถือและสามารถใช้ในการตรวจพบยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ด้วย

ในทางตรงข้าม จากรายงานของ Quintanar A และคณะ (Quintanar A, Jallu V, Legros Y *et al.* 1998) พบว่า วิธีการนี้สิ้นเปลืองทั้งเวลาและแรงงานในการทำ เนื่องจากมีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยาก ดังนั้น จึงไม่เหมาะกับการทดลองในห้องปฏิบัติการประจำวัน

2.4.2.2 **วิธี polymerase chain reaction with allele specific Oligonucleotide (PCR-ASO) hybridization**

เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาในปี 1991 โดย MC Farland JG และคณะ (Mc Farland JG, Aster RH, Bussel JB *et al.* 1991) เพื่อใช้ในการตรวจหาชนิดของยีนของเกล็ดเลือดที่ทำให้เกิดภาวะ NAITP โดยอาศัยตัวตรวจจับ (probe) ที่จำเพาะเพื่อตรวจจับสัญญาณที่เกิดขึ้นบน

แผ่นไนลอนเมมเบรน และนำไปตรวจวัดสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วยวิธี immunochemical assay ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถใช้กับการตรวจหาในตัวอย่างเซลล์ทารกที่ได้มาจากน้ำคร่ำ (fetal amniocytes) ได้ด้วย ซึ่งถือว่าเป็นข้อดีของวิธีนี้เพราะสามารถช่วยแก้ปัญหาของการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา ในกรณีที่ตัวอย่างมีจำนวนน้อยและใช้ในการตรวจก่อนคลอดได้ด้วยเช่นกัน

อย่างไรก็ตาม Simsek S และคณะ (Simsek S, Christiaens GCLM, Kanhai HHH *et al.* 1994) ได้ให้ความเห็นแตกต่างออกไปว่า วิธีนี้มีขั้นตอนการทำที่ต้องระมัดระวังในเรื่องของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งต้องควบคุมอย่างดี เพราะจะมีผลต่อการทดลอง และวิธีนี้ก็ไม่มีตัวควบคุมภายในระบบด้วย เช่นเดียวกับที่ Skogen B และคณะ ได้รายงานไว้ในปี 1994 (Skogen B, Bellissimo DB, Hessner MJ *et al.* 1994) ว่า วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้เวลาในการทดสอบนานและการแปลผลการทดลองทำได้ยากโดยเฉพาะในกรณีที่ Skogen B ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจางหรือมี backgrounds ปนอยู่

2.4.2.3 **วิธี polymerase chain reaction with single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)**

เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาโดย Orita M. และคณะ (Orita M, Suzuki Y, Sekiya T *et al.* 1989) โดยอาศัยไพรเมอร์ที่ติดด้วยสารกัมมันตภาพรังสีเป็นตัวตรวจหา และแปลผลโดยดูจากการเคลื่อนที่ของ DNA fragments

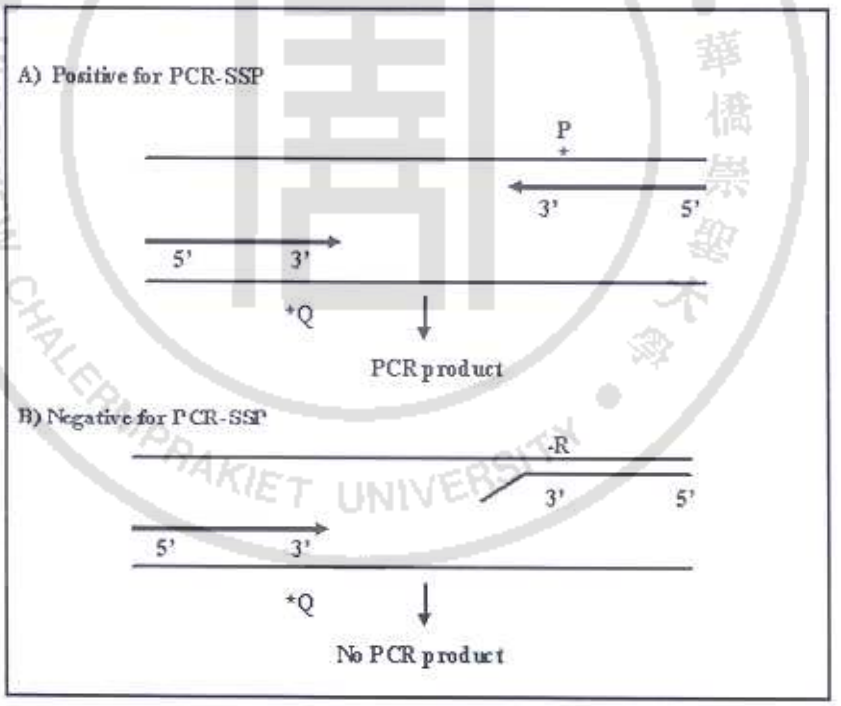
ต่อมา ในปี 1995 Peyruchaud O และคณะ (Peyruchaud O, Nurden A and Bourre F. 1995) ได้นำวิธีการนี้มาปรับปรุงใหม่ โดยเปลี่ยนมาใช้ silver stain แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี พบว่าเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและเหมาะสำหรับการนำไปใช้ในการทำ HPA genotyping ในกลุ่มของผู้บริจาคโลหิตจำนวนมากๆ

ต่อมาในปี 1998 Quantanar A และคณะ (Quintanar A, Jallu V, Legros Y *et al.* 1998) ได้ปรับปรุงวิธีนี้ขึ้นมาใหม่ โดยการใช้สารเรืองแสงเป็นตัวตรวจวัด ซึ่งทำให้สามารถวิเคราะห์ผลการทดลองได้ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ นอกจากนี้ วิธีนี้ยังสามารถตรวจพบยีนที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย

อย่างไรก็ตาม จากรายงานวิจัยของ Jin Y และคณะ (Jin Y, Dietz H, Nurden AT *et al.* 1992) พบว่า วิธี PCR-SSCP นี้ยังมีข้อเสียอยู่ที่ความยุ่งยากในการปรับหาสภาวะที่เหมาะสำหรับการตรวจหายีนที่อยู่บริเวณ exon ที่แตกต่างกัน อีกทั้งโดยวิธีนี้มีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาดขึ้นได้หากสภาวะการทดลองไม่เหมาะสมจะทำให้ไม่สามารถตรวจพบยีนที่มีความแตกต่างกันเพียงตำแหน่งเดียวได้

2.4.2.4 วิธี polymerase chain reaction with sequence-specific primer (PCR-SSP) หรือ polymerase chain reaction with allele specific amplification (PCR-ASA)

วิธีนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาในปี 1991 โดย Ugozzoli L และ Wallace RB (Ugozzoli L and Wallace RB. 1992) โดยใช้ชื่อว่า PCR-ASA วิธีการนี้อาศัยหลักการของความจำเพาะของไพรเมอร์ต่ออัลลีนของยีนที่ต้องการตรวจหา เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา ถ้าไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้นั้นจำเพาะกับยีนที่ต้องการตรวจ (ดังแสดงในรูปภาพที่ 3) เมื่อนำไปตรวจวัดผลที่เกิดขึ้นโดยขบวนการ electrophoresis จะพบแถบของยีนปรากฏให้เห็นบนแผ่นวุ้นที่ย้อมด้วย ethidiumbromide หรืออาจจะใช้วิธีการตรวจวัดด้วยเทคนิค ELISA ตามวิธีที่ Muller TH และคณะรายงานไว้ในปี 1997 ก็ได้ (Muller TH, Doscher A and Schunter F. 1997)



รูปภาพที่ 3 แสดงหลักการตรวจโดยวิธี PCR-SSP

จากรายงานของ Metcalft P และ Waters AH (Metcalfe P and Waters AH. 1993) พบว่า วิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 1 (HPA-1) ภายในเวลา 2 ชั่วโมง โดยไม่ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการทดสอบ

ต่อมาในปี 1994 Simsek S และคณะวิจัย (Simsek S, Bleekek PMM, Heeremans J *et al.* 1994) ได้พัฒนาวิธี PCR-ASA ขึ้นมาเพื่อใช้ในการตรวจหา HPA-5 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน human growth hormone (HGH) เป็นตัวควบคุมภายในการตรวจ ซึ่งถ้าระบบการทดลองผิดพลาดแถบของยีนนี้ก็จะไม่ปรากฏให้เห็น

ในปัจจุบันการนำเทคนิค PCR-SSP มาใช้ตรวจหาชนิดและความถี่ของยีน HPA เป็นที่นิยมแพร่หลายกันอย่างมาก ในทางการรักษา การตรวจหาชนิดของยีน HPA ในผู้ป่วยจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องตรวจให้ได้ผลที่ถูกต้อง ครบถ้วนและรวดเร็ว เพื่อจะได้นำไปคัดเลือกหาผู้บริจาคเกล็ดเลือดที่เหมาะสมต่อไป

ในปี 1997 Chen DF และคณะ (Chen DF, Pastucha LT, Chen HY *et al.* 1997) ได้รายงานข้อดีของการใช้เอนไซม์ "Ampli Taq Gold" DNA polymerase ในการตรวจหายีน HPA โดยการพัฒนา *Thermus aquaticus* DNA polymerase ให้อยู่ในสภาวะที่ยังไม่สามารถทำงานได้โดยต้องถูกกระตุ้นด้วยความร้อนก่อนจึงจะสามารถทำงานได้ เพื่อลดการจับกันของ primer อย่างไม่จำเพาะที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการเตรียมการทำ PCR ผลการทดลองนอกจากจะไม่พบการจับกันอย่างไม่จำเพาะของ primer แล้วยังพบว่า PCR product ของ HPA-5 เกิดขึ้นจางกว่าระบบอื่น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้แก้ไขโดยการเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ให้มากกว่าระบบอื่น ทำให้สามารถเห็นแถบของ HPA-5 ได้ชัดเจนขึ้น

ต่อมา Meyer O. และคณะ (Meyer O, Hildebrandt M, Schulz B *et al.* 1999) ได้พัฒนาเทคนิค PCR-SSP เพื่อใช้ในการตรวจหายีน HPA-1 ถึง 6 โดยใช้ดีเอ็นเออ้างอิงที่ทราบชนิดของยีนทั้ง 6 ระบบและดีเอ็นเอของผู้บริจาคเลือดจำนวน 100 ราย ในงานวิจัยนี้ Meyer และคณะได้ออกแบบ primer ของระบบที่ 5 ใหม่ เพื่อให้สามารถตรวจหา HPA-1 ถึง 6 ได้โดยใช้อุณหภูมิการทดลองที่เหมือนกัน ทำการตรวจหายีนทั้ง 6 ระบบได้พร้อมกัน จากการวิจัยพบว่า PCR product ของ HPA-5 และ 6 ที่ได้บางครั้งจะเกิดขึ้นจางๆ หรือหายไป อย่างไรก็ตาม เทคนิคนี้สามารถตรวจหายีน HPA-1 ถึง 6 ได้อย่างถูกต้องและพร้อมกันในเวลาเพียง 2 ชั่วโมง

จากรายงานของ Jau YL และคณะผู้วิจัย (Jau YL, Ying JC, Hui YH *et al.* 2002) ซึ่งได้ทำการตรวจหายีน HPA-1 ถึง 13w โดยใช้ primer ที่เคยมีการตีพิมพ์มาก่อนและสามารถตรวจหายีนทั้ง 13 ระบบโดยใช้อุณหภูมิที่เหมือนกันได้ภายในเวลา 4 ชั่วโมง การศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยใช้ตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคเลือดทั่วไปของประเทศได้หวันจำนวน 300 ราย เพื่อศึกษาหาความถี่ของยีนทั้ง 13 ระบบของประชากรได้หวัน และพบว่ายีน HPA-3 มีการกระจายตัวมากที่สุดโดยพบความถี่ของยีน HPA-3a/HPA-3a = 0.3267 HPA-3a/HPA-3b = 0.4967 และ HPA-3b/HPA-3b = 0.1767 ยีนที่เหลืออีก 12 ระบบพบว่าส่วนใหญ่เป็น homozygous a/a (range 0.9200-0.9967) ยกเว้นความถี่ของ

ยีน HPA-7 ถึง 10 ซึ่งพบว่าเป็น homozygous a/aทั้งหมด (= 1.0000) จากการวิจัยนี้ทำให้สามารถตรวจหาชนิดของยีน HPA ได้อย่างรวดเร็ว และช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะ alloimmune thrombocytopenia ได้อย่างน่าเชื่อถือ รวมทั้งสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาความถี่ของยีนในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ได้ด้วย

ในประเทศไทย มีรายงานการใช้วิธี PCR-SSP มาใช้ในการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดแล้ว 6 ระบบ ได้แก่ HPA-1 ถึง 6 โดยวิธีของ Romphruk AV และคณะ (Romphruk AV, Akahat J, Srivanichrak P *et al.* 2000) นั้นสามารถใช้ในการตรวจหายีน HPA-1 ถึง 6 ของผู้บริจาคโลหิตไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 400 ราย ทั้ง 6 ระบบไม่สามารถทำการตรวจได้พร้อมกัน ต้องแยกตรวจคนละอุณหภูมิ ทำให้ต้องเพิ่มเวลาและขั้นตอนในการตรวจ แต่จากรายงานของ Kongmaroeng C และคณะ (Kongmaroeng C, Tardtong P, Mongkolsuk T *et al.* 2545) ซึ่งได้ทำการตรวจหายีนทั้ง 6 ระบบในประชากรไทยภาคกลางนั้นสามารถตรวจได้พร้อมกันทั้ง 6 ระบบ ทำให้สามารถลดเวลาและขั้นตอนการตรวจลงได้อีก และพบว่าความถี่ของยีนทั้ง 6 ระบบ ไม่มีความแตกต่างจากผลการทดลองของ Romphruk AV และคณะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 7 ถึง 13 ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการตรวจในประเทศไทยมาก่อน