บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกเกล็ดเลือดของผู้บริจาคให้แก่ผู้ป่วย จำเป็นจะต้องใช้เกล็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่ตรงกันมากที่สุด ในภาวะเร่งด่วน การตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดให้ได้ครบทั้ง 16 ระบบภายในเวลาอันรวดเร็วจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่ง จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดเพียง 6 ระบบ งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดระบบที่ 7 ถึง 13 โดยวิธี PCR-SSP ขึ้นมา โดยได้ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรวจหายีนของแอนติเจนทั้ง 7 ระบบ และประเมินความถูกต้องและน่าเชื่อถือของวิธีการตรวจที่พัฒนาขึ้นมา เพื่อที่จะนำไปใช้ในการตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดของผู้ป่วยและผู้บริจาค ทำให้แพทย์และผู้เกี่ยวข้องสามารถคัดเลือกผู้บริจาคเกล็ดเลือดที่เหมาะสมที่สุดและนำเกล็ดเลือดนั้นมาให้แก่ผู้ป่วยได้อย่างรวดเร็ว ตลอดจนสามารถนำวิธีการตรวจนี้ไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

วิธีการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่ปรับปรุงขึ้นมานี้ทำให้สามารถตรวจหายีนของแอนติเจนทั้ง 7 ระบบ ได้แก่ HPA-7 ถึง 13 ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วภายในเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากที่สกัดดีเอ็นเอมาได้แล้ว ทั้งนี้ ในกรณีเร่งด่วนขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอนั้นสามารถใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปเพื่อลดเวลาในการทำงานลงได้ สำหรับค่าใช้จ่ายในการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดทั้ง 7 ระบบต่อจำนวนตัวอย่างที่ใช้ตรวจ 1 รายรวมกับตัวอย่างควบคุมชนิดลบด้วย คิดเป็นเงินทั้งสิ้นเพียง 750 บาท/ราย เพื่อทำให้ทราบชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดของผู้ป่วยและผู้บริจาคเพิ่มขึ้นมาได้อีกถึง 7 ระบบ ซึ่งจะช่วยทำให้มั่นใจได้ว่าเกล็ดเลือดที่คัดเลือกมาให้แก่ผู้ป่วยนั้นมีความเหมาะสมที่สุดซึ่งจะช่วยให้การรักษาเป็นไปในทางที่ดียิ่งขึ้น และการตรวจโดยวิธีนี้สามารถทำได้อย่างรวดเร็วด้วย

อภิปรายผล

การตรวจหาแอนติเจนของเกล็ดเลือดของมนุษย์ (human platelet antigen : HPA) สามารถตรวจได้ทั้งทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) และทางโมเลกุล (molecular) แต่การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยานั้นมีข้อจำกัดอยู่ที่แอนติซีรัมที่ใช้ในการตรวจซึ่งต้องมีความจำเพาะกับแอนติเจนของเกล็ดเลือดนั้นมีอยู่น้อย และปริมาณเกล็ดเลือดของผู้ป่วยที่ใช้ในการตรวจในภาวะนั้นก็มีอยู่จำนวนน้อย อีกทั้งการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยานั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนทัยป์ชนิดที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) ออกจากชนิดที่เป็นเฮตเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ ดังนั้น การตรวจหายีนของเกล็ดเลือดโดยวิธีทางโมเลกุลจึงช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ อย่างไรก็ตาม วิธีการตรวจทางโมเลกุลนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี ดังที่ได้กล่าวรายละเอียดในบทที่ 2 เช่น วิธี PCR-RFLP, PCR-ASO, PCR-SSCP และ PCR-SSP เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน และถึงแม้ว่าวิธี SBT จะมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือที่สุด แต่วิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ต้องอาศัยผู้ทดลองที่มีความชำนาญ และมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธี PCR-SSP เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ขั้นตอนการทำไม่ยุ่งยาก ทำให้สามารถตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งการตรวจโดยวิธีนี้ไม่มีข้อจำกัดในเรื่องของจำนวนตัวอย่างที่เหมาะสมต่อความคุ้มทุนในการตรวจแต่ละครั้ง ทำให้สามารถทำการตรวจได้ทันทีถึงแม้ว่าจะมีจำนวนตัวอย่างเพียงรายเดียวก็ตาม

เมื่อทำการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 7 ถึง 13 ตามวิธีของ Jau YL และคณะ ผลการตรวจพบว่า ในสภาวะที่ใช้ตรวจหายีนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 7 และระบบที่ 9 ถึง 13 นั้น สามารถนำมาตรวจหายีนของเกล็ดเลือดได้เพียง 5 ระบบ ได้แก่ระบบที่ 7 และระบบที่ 9 ถึง 12 แต่ไม่สามารถตรวจหายีนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 13 ได้ เช่นเดียวกับสภาวะที่ใช้ตรวจหายีนของเกล็ดเลือดระบบที่ 8 นั้นก็ไม่สามารถตรวจหายีนของเกล็ดเลือดในระบบดังกล่าวได้เช่นกัน และเมื่อทำการตรวจตามวิธีของ Kongmaroeng C. และคณะ พบว่าสามารถตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดได้เพียง 4 ระบบ ได้แก่ ระบบที่ 7 ถึง 10 แสดงให้เห็นว่าในสภาวะดังกล่าวนั้นยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจหายีน HPA ทั้ง 7 ระบบนี้ได้

ดังนั้น เมื่อคณะผู้วิจัยได้ทำการปรับปรุงวิธีการตรวจของ Jau YL และคณะ โดยการลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดระบบที่ 13 และใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ของการตรวจหายีนระบบที่ 7 ถึง 12 เป็นอุณหภูมิเดียวกัน ทำให้สามารถตรวจหายีนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 7 ถึง 13 ได้อย่างถูกต้องรวดเร็วและน่าเชื่อถือ ภายใต้การควบคุมผลการตรวจด้วยตัวอย่างควบคุมชนิดลบและตัวอย่าง

ควบคุมชนิดบวกที่ทราบชนิดของยีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดทั้ง 7 ระบบ โดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสที่จำเพาะต่ออัลลีนของยีนในระบบนั้นแล้ว

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ปรับเปลี่ยนปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ เพื่อให้สามารถตรวจตามผลผลิตที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจนและสะดวกต่อการเตรียม โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของไพรเมอร์แต่ละชนิดในจำนวนที่เท่ากัน ปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ สำหรับการตรวจหายีนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 7 ถึง 12 ให้เท่ากัน ทำให้สามารถใช้สารละลายของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของทั้ง 6 ระบบเป็นชุดเดียวกัน และใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอระหว่าง 200-300 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา เพื่อทำให้สามารถเห็นแถบของยีนที่ปรากฏได้ชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของผู้วิจัยเกี่ยวกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจ พบว่า ในดีเอ็นเอตัวอย่างบางรายที่มีระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 200 ng/reaction ก็สามารถนำมาใช้ในการตรวจโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ได้เช่นกัน

เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ไปใช้กับดีเอ็นเอของกลุ่มตัวอย่าง จำนวน 40 ราย พบว่า มีจำนวน 1 ราย (ดีเอ็นเอตัวอย่างลำดับที่ 24) ที่ให้ผลการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 10 เป็น HPA-10a,b แต่เนื่องจากไม่มีตัวอย่างอ้างอิงที่จำเพาะต่ออัลลีน b ของยีน HPA-7 ถึง 13 ดังนั้น ผู้วิจัยจึงใช้วิธีการตรวจซ้ำและการทดสอบควบคู่ไปกับตัวอย่างควบคุมชนิดที่ให้ผลบวกกับอัลลีน a และตัวอย่างควบคุมชนิดลบ โดยใช้ผู้ทำวิจัย 2 คน พบว่า ผลการตรวจยังคงให้ผลดังเดิม ทำให้เชื่อได้ว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถตรวจหายีนของเกล็ดเลือดระบบที่ 10 ของดีเอ็นเอตัวอย่างรายนี้ได้อย่างถูกต้องและน่าเชื่อถือ

นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ทดลองนำวิธีที่ปรับปรุงขึ้นมานี้ไปใช้ในการตรวจหายีนในระบบที่ 1 ถึง 6 ที่เคยรายงานไว้ในปี 2002 พบว่าวิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจหายีน HPA ทั้ง 6 ระบบได้ด้วยเช่นกัน แต่จะไม่กล่าวรายละเอียดไว้ ณ ที่นี้

จากงานวิจัยนี้ พบว่า ค่าใช้จ่ายของการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดทั้ง 7 ระบบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้ เป็นจำนวนเงินเพียง 750 บาทต่อราย ซึ่งเมื่อรวมกับค่าใช้จ่ายในการตรวจหายีนของระบบที่ 1 ถึง 6 ที่เคยมีรายงานไว้แล้วคิดรวมเป็นเงินประมาณ 1,000 บาทต่อราย แต่สามารถช่วยให้ตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดได้ถึง 13 ระบบ ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยได้รับเกล็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่ตรงกับของตนเองภายในเวลาอันรวดเร็ว อีกทั้งยังช่วยป้องกันการเกิดภาวะที่ไม่พึงประสงค์หลังการรับเกล็ดเลือด (transfusion reaction) ที่มีชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่ไม่ตรงกันได้ด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. การนำผลที่ได้จากการวิจัยไปใช้

จากผลการศึกษาการตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดในระบบที่ 7 ถึง 13 ในครั้งนี้ พบว่า สามารถตรวจหายีนทั้ง 7 ระบบได้อย่างถูกต้องพร้อมกันภายในเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ และยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจหายีนของระบบที่ 1 ถึง 6 ได้ด้วยเช่นกัน ดังนั้น การตรวจหายีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดโดยวิธีนี้จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการนำไปใช้ในการปฏิบัติงานประจำวันของห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาชนิดของแอนติเจนของเกล็ดเลือดให้แก่ผู้ป่วยที่มีความจำเป็นจะต้องได้รับเกล็ดเลือดที่มีชนิดของแอนติเจนที่ตรงกันภายในเวลาเร่งด่วน เพราะในกรณีที่มีจำนวนตัวอย่างเพียงรายเดียวก็สามารถทำการตรวจได้ทันทีโดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มเติม และยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาชนิดของยีนของแอนติเจนของเกล็ดเลือดผู้บริจาคเพื่อเก็บไว้เป็นข้อมูลของโรงพยาบาลและศูนย์บริการโลหิตสำหรับคัดเลือกและติดตามผู้บริจาคที่เหมาะสมให้แก่ผู้ป่วยในภาวะฉุกเฉินได้ด้วย นอกจากนี้ ยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาหาความถี่ของยีนทั้ง 7 ชนิดในกลุ่มประชากร เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาหาระบบของแอนติเจนของเกล็ดเลือดที่มีแนวโน้มจะก่อให้เกิดภาวะไม่พึงประสงค์หลังการรับเกล็ดเลือดได้ด้วย

2. ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

จากการศึกษาของผู้วิจัยเกี่ยวกับอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้นยังคงต้องใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยแบ่งเป็น 2 ชุด ได้แก่ที่อุณหภูมิ 61° และ 58° ซ. ดังนั้น หากห้องปฏิบัติการใดมีเครื่อง thermal cycle สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพียงเครื่องเดียวจะทำให้ต้องใช้เวลาในการตรวจหายีนทั้ง 7 ระบบนี้เพิ่มขึ้นมาอีก 2 ชั่วโมง 15 นาที ทำให้ได้ผลการตรวจช้าขึ้น ดังนั้น น่าจะมีการพัฒนาวิธีการตรวจที่ทำให้สามารถตรวจหายีนทั้งหมดให้ได้โดยพร้อมกันต่อไป ซึ่งจักเป็นประโยชน์ยิ่งขึ้นแก่หน่วยงานที่มีข้อจำกัดในเรื่องของเครื่องมือที่ใช้