บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นิวโทรฟิล (neutrophil) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation response) โดยจะทำหน้าที่เป็น phagocytosis เพื่อกลืนกินแอนติเจนแปลกปลอม (forensic antigen) ก่อนเกิดกระบวนการ apoptosis โดยเซลล์ neutrophil จะทำหน้าที่เป็น phagocyte ชนิดแรกที่ออกจากกระแสเลือดไปสู่เนื้อเยื่อที่มีสิ่งแปลกปลอม เนื่องจากบนผิวของ neutrophil มี receptor สำหรับส่วน complement fragment (Fc) ของ immunoglobulin (Ig) หรือที่เรียกว่า complement fragment gamma receptor (FcγR) ทำให้สามารถทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เคลือบด้วย antibody ชนิด IgG ได้ แอนติเจนของเซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า “ฮิวแมนนิวโทรฟิลแอนติเจน” (human neutrophil antigen: HNA) จะสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ทำให้เกิดการทำลายเซลล์ และเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ neutropenia หรือ granulocytopenia จากรายงานการศึกษาการเกิดภาวะ alloimmunization ในสตรีตั้งครรภ์พบว่า แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-1a (NA1) และ HNA-1b (NA2) ที่มารดาสร้างขึ้นสามารถกระตุ้นให้ทารกแรกคลอดหรือทารกที่อยู่ในครรภ์เสียชีวิตเนื่องจากภาวะ alloimmune neonatal neutropenia (ANN) (Kissel K *et al.* 2000) และพบว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดนี้ยังเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะ transfusion related acute lung injury (TRALI) และ chronic benign autoimmune neutropenia (AIN) ในเด็กได้อีกด้วย (Moritz E *et al.* 2009) จากการศึกษาที่ผ่านมา ทำให้ทราบว่า ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงความเป็นแอนติเจนของ neutrophil ตั้งอยู่บนแขนข้างยาวของ chromosome คู่ที่ 1 (1q23) บนที่รับที่มีความจำเพาะ (specific receptor) สำหรับ Fc ของ IgG ซึ่งมีอยู่ 3 classes ได้แก่ FcγRI, FcγRII และ FcγRIII และพบว่า FcγRIII ยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกด้วย (Ravetch JV and Perussia B. 1989; Hessner MJ *et al.* 1996; Bux J and Chapman J. 1997; Matsuo K *et al.* 2000) งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาประวัติการค้นพบแอนติเจน neutrophil การเรียกชื่อแอนติเจนชนิดต่าง ๆ ของ neutrophil ความสำคัญและวิธีที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจนแต่ละชนิด เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการทำวิจัย

2.1 ประวัติการค้นพบและการตั้งชื่อ Human Neutrophil Antigen

ในปี ค.ศ. 1971 Lalezari P และคณะ ได้รายงานการตรวจพบ neutrophil-specific antigen (NA1) โดยใช้วิธีการตรวจทาง serology เป็นครั้งแรกในซีรัมของผู้ป่วยที่ตั้งครรภ์และมีภาวะ

alloimmunization จนเป็นสาเหตุให้ทารกที่คลอดมาเกิดภาวะ neonatal neutropenia (Lalezari P *et al.* 1971)ในขณะนั้นยังไม่สามารถอธิบายคุณลักษณะที่จำเพาะของ NA1 ได้ว่ามีลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในลักษณะใด

ต่อมาในปี ค.ศ. 1965 Lalezari P และ Bernard GE ได้รายงานการตรวจพบแอนติเจน HNA เพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งชนิด คือ NA2 (Lalezari P and Bernard GE. 1965) และจากผลการตรวจหาความหลากหลายของยีน NA1 และ NA2 โดยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ sequencing based typing (SBT) พบว่ายีนของแอนติเจน NA2 นี้อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กับอัลลีล (allele) ของ NA1 และมีลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันเพียง 5 base pair (bp) เท่านั้น (Matsuo K *et al.* 2000)

ในปี ค.ศ. 1971 Lalezari P และคณะ ได้รายงานการตรวจพบแอนติเจน NB1 หรือ HNA-2a จากการศึกษาในทารกแรกคลอด 7 ราย ซึ่งกำเนิดมาจาก 4 ครอบครัว โดยพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน NB1 จะไม่ทำปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (non agglutination) กับเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ ยกเว้นเซลล์ neutrophil (Lalezari P *et al.* 1971) เช่นเดียวกับในเรื่องของการถูกดูดซับ (absorption) ของแอนติเจน NB2 ที่จะไม่ถูกดูดซับโดยเซลล์ที่เตรียมมาจาก solid organ และเซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น ๆ ยกเว้น neutrophil และจากการศึกษาทาง molecular ยังพบว่ายีน *NB* อยู่คนละโลคัส (locus) กับยีน *NA* และมีการกระจายตัวของยีน *NB1* แบบโฮโมไซกัส (homozygous) ประมาณ 68% ของประชากรชาวนิวยอร์ก (New York) และแบบเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) ประมาณ 29% ในขณะที่อีกประมาณ 3% ของประชากรนั้นให้ผลเป็นลบ (negative) ไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังสรุปว่า ยีน *NB* นี้เป็นยีนที่ตั้งอยู่คนละตำแหน่งกับยีน *HLA* และยีนอื่น ๆ ที่แสดงออกถึงแอนติเจนของเม็ดเลือดขาว (leukocyte) และยังไม่มีรายงานอุบัติการณ์ของความสัมพันธ์ระหว่างแอนติเจน NA, NB และแอนติเจนของเม็ดเลือดแดง

ในขณะที่แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน 5b ตรวจพบได้ในซีรัมของผู้ป่วยที่เกิดภาวะ TRALI (Nordhagen R *et al.* 1986) ต่อมาแอนติเจนนี้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น HNA-3a ซึ่งจะพบการแสดงออกของแอนติเจนได้บนเซลล์ของเกล็ดเลือด ลิมโฟไซท์ และอวัยวะต่าง ๆ เช่น ไต (kidney) ม้าม (spleen) และเซลล์รก (placental cells) จากการศึกษาในเบื้องต้นพบว่า แอนติเจน HNA-3a มีการแสดงออกของแอนติเจนได้หลากหลายแต่ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัด (Bux J. 2002) จนกระทั่งมีการศึกษาเพิ่มเติม ในปัจจุบันพบว่าแอนติเจน HNA-3a นี้มีคุณลักษณะเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ขนาด 70 – 95 กิโลดัลตัน (kiloDalton: kDa) ซึ่งเกิดจากความหลากหลายของยีน choline transporter-like protein-2 gene (*SLC44A2*) เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน (amino

acid) ในตำแหน่งที่ 154 จากอาร์จินีน (arginine) เป็นกลูตามีน (glutamine) (Greinacher A *et al.* 2010)

สำหรับแอนติเจน HNA-4a นั้น มีรายงานการค้นพบในปี ค.ศ. 1986 โดย Kline WE และคณะ โดยใช้ชื่อว่า แอนติเจน MART อันเนื่องมาจากซีรัมของผู้บริจาคเลือดเพศหญิงที่เคยตั้งครรภ์มาแล้วสามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับแกรนูโลไซท์ (granulocyte) ที่มีแอนติเจนที่ไม่ทราบชนิด และไม่ใช่แอนติเจนของ neutrophil ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว ได้แก่ NA1, NA2, NB1, NC1, ND1, NE1, 5a, 5b และ 9a รวมทั้งไม่ใช่แอนติเจนของเม็ดเลือดแดงและ HLA ด้วย (Kline WE *et al.* 1986) แอนติเจนชนิดใหม่นี้สามารถพบได้ในปริมาณมากบนผิวเซลล์แกรนูโลไซท์และโมโนไซท์ (monocyte) และพบได้น้อยบนผิวเซลล์ T lymphocytes อีกทั้งไม่สามารถพบได้บนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด และ B lymphocytes และจากการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนในสมาชิกของครอบครัวพบว่า แอนติเจนนี้ได้รับมาจากยีนซึ่งมีลักษณะเป็นยีนเด่นทางออโตโซม (autosomal dominant inheritance) และสามารถตรวจพบได้ในสมาชิกของครอบครัวของกลุ่มตัวอย่าง 5 ใน 12 ราย รวมทั้งไม่มีความสัมพันธ์กับยีน *HLA*, *NA*, *Rh* และ *XY* ด้วย

ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Simsek S และคณะ ได้รายงานการค้นพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน Ond(a) และ Mart(a) ซึ่งทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของ CD11a และ CD11b ที่อยู่ในกลุ่มของ β2 integrin family ในหน่วยย่อย (subunit) ของ αL และ αM คณะผู้วิจัยได้นำเอาเทคนิค reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) มาใช้ในการจำแนกโมเลกุลของ Ond(a) และ Mart(a) ในตำแหน่งของ αL และ αM mRNA เพื่อดูการแทนที่ของนิวคลิโอไทด์ใน αL ตำแหน่งที่ 2466 (G2466C substitution) ของแอนติเจน Ond(a) และการแทนที่ของนิวคลิโอไทด์ใน αM ตำแหน่งที่ 302 (G302A substitution) ของแอนติเจน Mart(a) และทำการทดสอบหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนทั้งสองด้วยวิธี monoclonal antibody-specific immobilization of leukocyte antigens, immunofluorescence assay และ immunoprecipitation

ภายหลังได้มีรายงานการตรวจพบแอนติเจนของ neutrophil ชนิดใหม่อีกหลายชนิด ทำให้มีการเรียกชื่อหรือตั้งชื่อแอนติเจนเหล่านี้แตกต่างกันออกไป เกิดความซ้ำซ้อนของแอนติเจนชนิดเดียวกันแต่ใช้ชื่อต่างกันตามชื่อผู้ค้นพบ อีกทั้งการตั้งชื่อแอนติเจนเหล่านั้นไม่ได้สอดคล้องกับยีนและตำแหน่งของยีนที่แสดงความเป็นแอนติเจนนั้นตามหลักการตั้งชื่อของ The Guideline for Human Gene Nomenclature ดังนั้น ในปี ค.ศ. 1998 คณะกรรมการการตั้งชื่อแอนติเจนของเม็ดเลือดของ International Society of Blood Transfusion (ISBT) จึงจัดประชุมผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและผู้ที่ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแอนติเจนของ neutrophil ขึ้น เพื่อร่วมกันจัดระบบการเรียกชื่อแอนติเจนของ neutrophil ให้เป็นมาตรฐานเดียวกันและเพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาในระดับสูงขึ้นไป โดยอาศัย

แนวทางการตั้งชื่อตามรูปแบบของ The guideline for Human Gene Nomenclature กำหนดการเรียกชื่อแอนติเจนของ neutrophil ดังนี้ (ตารางที่ 2.1)

1) ชื่อแอนติเจนของ neutrophil จะถูกเรียกใหม่เป็น human neutrophil antigen และใช้อักษรย่อเป็น HNA การกำหนดการเรียกชื่อใหม่นี้ชี้ให้เห็นว่า แอนติเจนเหล่านี้จะแสดงออกบนผิว neutrophil
2) ให้ระบุตำแหน่งที่พบแอนติเจนบน membrane ของ neutrophil ด้วยตัวเลขจำนวนเต็ม เช่น แอนติเจนที่พบบน FcγRIIIb ให้แทนด้วยเลข 1 และเรียกชื่อแอนติเจนของ neutrophil ที่พบบน FcγRIIIb นี้ว่า HNA-1 และแอนติเจนที่อยู่บน *CD177* ให้แทนด้วยเลข 2 เรียกชื่อแอนติเจนนั้นว่า HNA-2 เป็นต้น
3) การแยกความหลากหลาย (polymorphism) ของแอนติเจนที่พบบนตำแหน่งเดียวกัน ให้ใช้อักษรภาษาอังกฤษ (ตัวพิมพ์เล็ก) ตามหลังตัวเลขที่แสดงตำแหน่งของแอนติเจน โดยเรียงตามลำดับการค้นพบ เช่น HNA-1a, HNA-1b, … เป็นต้น
4) การระบุชื่อ alleles ที่ถอดรหัส (encode) มานั้น ให้ระบุตามตำแหน่งที่ตั้งของยีนที่แสดงออกถึงแอนติเจนนั้น ๆ แล้วตามด้วยเครื่องหมายดอกจันทร์ (*) และตัวเลขลำดับการค้นพบยีนหรือแอนติเจน

ตารางที่ 2.1 การเรียกชื่อแอนติเจน HNA ตามระบบของ ISBT working party (Stroncek D and Bux J. 2002)

Antigen system	**Antigen**	**Location**	**Fomer name**	**Alleles**
HNA-1	HNA-1a	FcγRIIIb	NA1	*FCGR3B*1*
	HNA-1b	FcγRIIIb	NA2	*FCGR3B*2*
	HNA-1c	FcγRIIIb	SH	*FCGR3B*3*
HNA-2	HNA-2a	CD177 (NB1glycoprotein)	NB1	*CD177*1*
HNA-3	HNA-3a	70-95 kDa glycoprotein	5b	Not define
HNA-4	HNA-4a	CD11b (CR3ψ)	Mart[a]	*CD11B*1*
HNA-5	HNA-5a	CD11a (LFA-11ψ)	Ond[a]	*CD11A*1*

CR3ψ = C3bi receptor; LFA-1 = leukocyte function antigen-1

* ISBT HNA nomenclature

จากข้อมูลทั้งหมด ปัจจุบันแอนติเจน HNA มีทั้งหมด 5 ระบบ ประกอบด้วย HNA-1, HNA-2, HNA-3, HNA-4 และ HNA-5

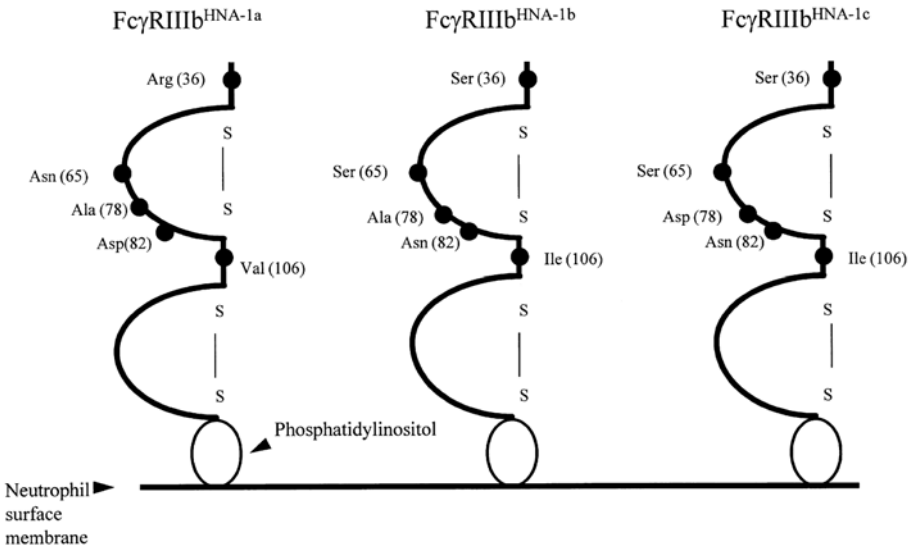
1) แอนติเจน HNA ระบบที่ 1 (HNA-1 system)

แอนติเจน HNA ระบบที่ 1 (HNA-1) แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c แอนติเจนเหล่านี้เดิมถูกตั้งชื่อว่า แอนติเจน NA1, NA2 และ SH ตามลำดับ (Lalezari P. 1977) แอนติเจนทั้งสามชนิดสามารถพบได้บน FcγRIIIB ของเซลล์ neutrophil โดยเฉพาะในกลุ่มของ segmented neutrophil แอนติเจนในระบบนี้จะถูกถอดรหัส (encode) มาจากยีน *Fcγ receptor* (*FcγR / FCGR*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 (1q23) ในบริเวณที่มีกลุ่มของยีน *FCGR* อยู่ 2 กลุ่ม คือ *FCGR2* และ *FCGR3* ยีนในกลุ่ม *FCGR3* จะประกอบด้วย *FCGR3A* และ *FCGR3B* ซึ่งอยู่ใกล้กันและมีความเหมือนกันสูง (highly homologous) จากการศึกษาลำดับการเรียงตัวของเบสภายในยีนทั้งสองชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันตรงตำแหน่งที่ 733 นิวคลิโอไทด์ของยีน *FCGR3B* จะเปลี่ยนจาก T มาเป็น C ทำให้เกิดเป็น stop codon ส่งผลให้จำนวนกรดอะมิโน (amino acid) ของ *FCGR3B* น้อยกว่า *FCGR3A* อยู่ 21 ชนิด (ตารางที่ 2.2) (Hillyer C *et al.* 2007) เนื่องจากการแสดงออกของแอนติเจน HNA-1 ถูกควบคุมโดยยีน *FCGR3B* ได้แก่ *FCGR3B*1, FCGR3B*2* และ *FCGR3B*3* โดยแอนติเจน HNA-1a จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บน *FCGR3B*1* allele ในขณะที่ HNA-1b และ HNA-1c จะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บน *FCGR3B*2* allele และ *FCGR3B*3* allele ตามลำดับ ดังนั้นการจำแนกชนิดของแอนติเจน HNA-1 จึงอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *FCGR3B* ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 36, 65, 78, 82 และ 106 (รูปที่ 2.1) ความแตกต่างระหว่าง HNA-1a และ HNA-1b อยู่ที่ตำแหน่งที่ 36, 65, 82 และ 106 ในขณะที่ความแตกต่างระหว่าง HNA-1b และ HNA-1c จะอยู่ในตำแหน่งที่ 78 เพียงตำแหน่งเดียว โดยกรดอะมิโนที่บ่งชี้ความจำเพาะของ HNA-1b คือ Ala และ HNA-1c คือ Asp จากความแตกต่างของกรดอะมิโนในตำแหน่งต่าง ๆ ทำให้แต่ละ allele จะมีลำดับเบสบริเวณ exon 3 ของ *FCGR3B* แตกต่างกัน เช่น HNA-1a และ HNA-1b จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกันในตำแหน่ง 141, 147, 227, 277 และ 349 และลำดับของเบสที่ใช้แยก HNA-1c ออกจาก HNA-1a และ HNA-1b อยู่ที่ตำแหน่ง 266 (Kissel K *et al.* 2000; Stroncek D. 2002) จากความแตกต่างดังกล่าวจึงนำมาสู่การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจน HNA ทางอณูชีววิทยาด้วยเทคนิคต่าง ๆ (Flesch BK *et al.* 2002; Costa E *et al.* 2004; Abou-Chaker K *et al.* 2009; Norcia AM *et al.* 2009)

ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างของลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *FCGR3A* และ *FCGR3B*

		Base Pair Position										
Molecule	**Gene**	**141**	**147**	**227**	**266**	**277**	**349**	**473**	**505**	**559**	**641**	**733**
FcγRIIIB HNA-1a	*FCGR3B*1*	AGG	CTC	A***A***C	GCT	GAC	***G***TC	GAC	CAC	GTT	TCT	TGA*
FcγRIIIB HNA-1b	*FCGR3B*2*	AG***C***	CT***T***	AGC	GCT	***A***AC	ATC	GAC	CAC	GTT	TCT	TGA*
FcγRIIIB HNA-1c	*FCGR3B*3*	AG***C***	CT***T***	AGC	G***A***T	***A***AC	ATC	GAC	CAC	GTT	TCT	TGA*
FCGR3A	*FCGR3A*	AGG	CTC	AGC	GCT	GAC	ATC	G***G***C	***T***AC	***T***TT	T***T***T	***C***GA

* Stop codon Differences among genes are in bold



รูปที่ 2.1 ความแตกต่างของกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อ HNA-1 บน FcγRIIIb (Lucas GF and Metcalfe P. 2000)

จากการศึกษาของ Nagarajan S และคณะ ชี้ให้เห็นว่า ความหลากหลายของ FcγRIIIB มีผลต่อการทำงานของ neutrophil เซลล์ที่มีการแสดงออกแบบ homozygous NA2 (HNA-1bb) จะมีความสามารถในการจับ (affinity) กับ IgG3 ได้ต่ำกว่าเซลล์ที่เป็น homozygous NA1 (HNA-1aa) (Nagarajan S *et al.* 1995) ดังนั้น เซลล์เม็ดเลือดขาว neutrophil ของคนที่เป็น homozygous NA2 จึงมีความสามารถในการกำจัด (phagocyte) เชื้อแบคทีเรียและเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ถูกกระตุ้นด้วย anti-Rh (IgG1 และ IgG3) ได้ต่ำกว่าคนที่เป็น homozygous NA1 (Salmon JE *et al.* 1990)

เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่เป็นโรค chronic granulomatous ซึ่งมียีนแบบ homozygous *NA2* และ heterozygous *NA* จะพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อในทางเดินอาหาร (gastrointestinal infection) ได้สูงกว่าคนที่ไม่มียีน *NA2* (Foster CB *et al.* 1998)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ชี้ให้เห็นถึงความบกพร่องในการแสดงออกของ FcγRIIIB จะส่งผลให้เกิดการขาดหายไปของแอนติเจน HNA-1a และ -1b โดยเฉพาะบนผิวเซลล์เม็ดเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะ paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) ซึ่งจะมีการขาดหายไปของ GPI-linked glycoproteins ทำให้ granulocyte ของผู้ป่วยมีจำนวนของ FcRIIIb และ HNA-1 ลดลง (Huizinga TW *et al.* 1990; Huizinga TW *et al.* 1990) และจากการวิเคราะห์ยีน *FcγRIIIB* ของกลุ่มตัวอย่าง 21 ราย ซึ่งมาจาก 14 ครอบครัวที่ตรวจพบความบกพร่องของ FcγRIIIB ผลการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดไม่พบทั้งยีน *FcγRIIIB* และยีน *FcγRIIC* ซึ่งอยู่ติดกันด้วย (de Haas M *et al.* 1995) ด้วยเหตุนี้ จึงมีรายงานการตรวจพบลักษณะการขาดหายไปของแอนติเจน HNA-1 หรือที่เรียกว่า HNA-1 null ในชนผิวขาว ประมาณ 0.1% (Fromont P *et al.* 1992)

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในระบบนี้สามารถทำให้เกิดภาวะ alloimmune neonatal neutropenia (ANN), autoimmune neutropenia (AIN), transfusion related acute lung injury (TRALI) (Han TH *et al.* 2006; Bux J. 2008; Gottschall JL *et al.* 2011) ภาวะดังกล่าวจะทำให้ผู้ป่วยเกิดความผิดปกติของร่างกายได้แตกต่างกัน บางรายอาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต

2) แอนติเจน HNA ระบบที่ 2 (HNA-2 system)

แอนติเจนในระบบนี้มีเพียงชนิดเดียว คือ HNA-2a ซึ่งมีชื่อเดิมว่า NB1 โมเลกุลที่แสดงออกถึงความเป็นแอนติเจนนี้จะอยู่ที่ตำแหน่งของ CD177 บนผิวเซลล์ของ neutrophil ภายใต้การควบคุมของยีน *CD177*1* บนโครโมโซมคู่ที่ 19 (19q13.2) จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโปรตีน NB1 โดย Kissel K และคณะ ชี้ให้เห็นว่า NB1 เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ *Ly6* superfamily gene หรือที่เรียกว่า urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) หรือ พิษงู (snake toxin) (Kissel K *et al.* 2001) ในส่วนของยีน *CD177* ที่สามารถแปลรหัสได้ (coding region) จะประกอบด้วยนิวคลิโอไทด์ จำนวน 1,311 base pair (bp) ซึ่งจะถูกถอดรหัสมาเป็นโปรตีน จำนวน 416 ตัว จากการศึกษาพบว่าโปรตีน NB1 glycoprotein (gp) นี้จะมีลักษณะที่แตกต่างจากโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มของ Ly6 คือประกอบด้วยตำแหน่งของ cystein-rich domain จำนวน 2 domains แต่ละ domain จะมีจำนวนของ cystein เพียง 6 ตัว ในขณะที่โปรตีนในกลุ่มของ Ly6 ชนิดอื่น ๆ จะมี cystein-rich doman เพียง 1 domain ยกเว้น uPAR ซึ่งจะมี 3 domains นอกจากนี้ยังพบว่า NB1 นั้นจะมีตำแหน่งของ N-linked glycosylation site จำนวน 3 ตำแหน่ง และตำแหน่งของ ω-site สำหรับ

การยึดจับของ glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor อีก 1 ตำแหน่งด้วย อย่างไรก็ตาม การทำงานของโปรตีนทั้งสามชนิดยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน

การแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a จะพบได้ทั้งบนผิวเซลล์ neutrophil, neutrophilic myelocyte และ metamyelocyte รวมทั้งยังสามารถพบได้บน plasma membrane และsecretory vesicles อีกด้วย (Goldschmeding R *et al.* 1992) โดยจะพบการแสดงออกบนผิวเซลล์ neutrophil ของผู้หญิงได้มากกว่าผู้ชาย และในผู้หญิงจะพบการแสดงออกลดลงตามอายุ ในขณะที่ในเพศชายจะมีการแสดงออกของแอนติเจนคงที่ ชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) น่าจะมีผลต่อการแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a ซึ่งตรงกับผลการวิจัยของ Caruccio L และคณะ ที่พบการแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a บนผิวเซลล์ neutrophil ของหญิงตั้งครรภ์ได้มากกว่าในผู้บริจาคเลือดเพศหญิงด้วย (Caruccio L *et al.* 2003) ในทางตรงข้าม จากการศึกษาของ Foster CB และคณะ ในปี ค.ศ. 1998 และการศึกษาของ Goldschmeding R และคณะ ในปี ค.ศ. 1992 พบว่าการแสดงออกของแอนติเจน HNA-2a จะลดลงในผู้ป่วยที่มีภาวะ PNH และ chronic myelogenous leukemia (CML) แต่ยังไม่ทราบความสำคัญทางคลินิกของการไม่แสดงออกของแอนติเจน NB1 บนผิวเซลล์ neutrophil (Goldschmeding R *et al.* 1992; Foster CB *et al.* 1998) รวมทั้งยังไม่พบการเพิ่มขึ้นของความเสี่ยงจากการติดเชื้อหรือเกิดภาวะ autoimmune disorder ในผู้ที่ไม่มีแอนติเจน NB1 อย่างไรก็ตาม เคยมีรายงานการตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน NB1 ในมารดาที่ไม่มีการแสดงออกของแอนติเจน NB1 (NB1-negative mother) ซึ่งตั้งครรภ์บุตรที่มีแอนติเจน NB1 (NB1-positive neonate) ส่งผลให้ทารกแรกคลอดเกิดภาวะ alloimmune neutropenia การให้ส่วนประกอบของเลือดที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ NB1 (HNA-2a) สามารถทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ febrile transfusion reaction และ TRALI ได้เช่นเดียวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HNA-1 (Bux J. 2001; Fadeyi EA *et al.* 2007) อีกทั้งยังสามารถทำให้เกิดภาวะ drug-induced neutropenia และ graft failure ภายหลังการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) ได้ด้วย (Pocock CF *et al.* 2001)

3) แอนติเจน HNA ระบบที่ 3 (HNA-3 system)

ปัจจุบัน แอนติเจนในระบบนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ HNA-3a มีชื่อเดิมว่า 5b และ HNA-3b ชื่อเดิมคือ 5a แอนติเจน HNA-3a เป็นแอนติเจนชนิดแรกที่ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1964 โดย van Leeuwen A และคณะ แอนติเจนนี้จะมีการแสดงออกที่ตำแหน่ง 70 - 95 kDa ของ glycoprotein พบได้ทั้งบนผิวเซลล์ neutrophil และ lymphocyte (Van Leeuwen A *et al.* 1964; Reil A *et al.* 2011) จากการศึกษาทางด้าน cytogenetic พบว่าแอนติเจนในระบบนี้จะถูกสร้างขึ้นโดยยีนที่อยู่บน

โครโมโซมคู่ที่ 4 นอกจากนี้ยังพบว่า แอนติเจนในระบบนี้ (HNA-3a/3b) เกิดจากความหลากหลายของนิวคลิโอไทด์ของยีน *choline transporter-like protein-2* (*SLC44A2*) ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 154 จาก glutamine เป็น arginine (461 G>A; Arg154Gln) (Greinacher A *et al.* 2010; Reil A *et al.* 2011)

มีรายงานวิจัยหลายฉบับชี้ให้เห็นว่า แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HNA-3a สามารถทำให้เกิดภาวะ febrile transfusion reaction และ neonatal alloimmune neutropenia ได้เช่นเดียวกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในระบบที่ 1 และ 2 อีกทั้งยังสามารถทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ TRALI อย่างรุนแรงได้ด้วย (Davoren A *et al.* 2003; Silliman CC *et al.* 2007; Reil A *et al.* 2011) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HNA-3 นี้สามารถพบได้ในพลาสมาที่ปนอยู่ในส่วนประกอบของเลือดรับบริจาคโดยเฉพาะในพลาสมาสดแช่แข็ง (fresh frozen plasma; FFP) และเกล็ดเลือด (platelet) ที่เตรียมมาจากเลือดของผู้บริจาคเพศหญิงที่เคยตั้งครรภ์มาก่อน (Davoren A *et al.* 2003)

4) แอนติเจน HNA ระบบที่ 4 (HNA-4 system)

แอนติเจนในระบบนี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1986 โดย Kline WE และคณะ โดยเรียกชื่อแอนติเจนนี้ว่า Mart^a ต่อมาจึงเปลี่ยนเป็น HNA-4a (Kline WE *et al.* 1986) จากการศึกษาต่อมาพบว่าแอนติเจนนี้อยู่บน β2-integrin ที่อยู่ในกลุ่มของ Leu-CAM family แอนติเจน HNA-4a เกิดจากความหลายหลายของ CD11b (C3bi receptor: CR3ψ) ในตำแหน่งที่ 302 (G302A) บนผิวเซลล์ของ neutrophil ส่งผลให้เกิดการแทนที่ของอาร์จินีน (arginine) กับฮีสทิดีน (histidine) ในตำแหน่งที่ 61 และยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจนนี้คือ *CD11B*1* (Simsek S *et al.* 1996) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-4a สามารถทำให้เกิดภาวะ ANN และ AIN (Fung YL *et al.* 2003)

5) แอนติเจน HNA ระบบที่ 5 (HNA-5 system)

แอนติเจนในระบบนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ HNA-5a ซึ่งอยู่ในส่วนของ α chain บน CD11a (LFA-1) ของ β2-integrin ซึ่งมีการแสดงออกบนเซลล์ leukocyte และทำหน้าที่ในการยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียง (cell adhesion molecule) แอนติเจนนี้ถูกค้นพบโดย Decary F และคณะ ด้วยการใช้ซีรัมของผู้ป่วยชื่อ “OND” ซึ่งมีภาวะ hypoplastic anemia และได้รับการรักษาด้วยการให้เกล็ดเลือดติดต่อกันมาเป็นเวลานานมาทำการทดสอบหาความจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีของเม็ดเลือดขาว ดังนั้น จึงตั้งชื่อแอนติเจนนี้ว่า Ond^a ต่อมาจึงถูกเปลี่ยนเป็น HNA-5a (Decary F *et al.* 1979) จากการศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกของแอนติเจนนี้คือ

ยีน *CD11A*1* และแอนติเจน HNA-5a เกิดจากการแทนที่ของนิวคลิโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2466 (G2466T) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 776 จากอาร์จินีน (arginine) เป็นทรีโอนีน (threonine) (Simsek S *et al.* 1996) แอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-5a สามารถทำให้เกิดภาวะ ANN และ TRALI ได้

2.2 เทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาแอนติเจน HNA-1

ในอดีตการตรวจหา HNA-1 นิยมใช้วิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serology) โดยในปี ค.ศ. 1986 Hadley H และคณะ ได้ประยุกต์ใช้หลักการ chemiluminescene ร่วมกับวิธีการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาเพื่อตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil เรียกวิธีการตรวจนี้ว่า granulocyte chemiluminescence test (GCLT) เพื่อใช้ในการตรวจหา anti-granulocyte antibodies ในเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะ unexplained neutropenia โดยการวัดการตอบสนองของเมตาบอลิกของ monocyte ต่อ antibody-coated granulocytes เปรียบเทียบกับการทดสอบโดยวิธี granulocyte indirect immunofluorescence (GIFT) ซึ่งริเริ่มใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1977 คณะผู้วิจัยได้ชี้ให้เห็นว่าวิธี GCLT เป็นวิธีที่รวดเร็ว ทำได้ง่าย และมีความไว (sensitivity) สูงกว่าวิธี GIFT (Verheugt FW *et al.* 1977; Hadley AG *et al.* 1986) และได้ถูกพัฒนามาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดง เกล็ดเลือด และแกรนูโลไซต์ เพื่อวินิจฉัยภาวะทางคลินิกที่สำคัญ เช่น การตรวจหาแอนติบอดีที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN), alloimmune thrombocytopenia และ alloimmune neutropenia เป็นต้น (Hadley AG *et al.* 1992)

ต่อมาในปี ค.ศ.1996 Bux J ได้ใช้วิธี granulocyte agglutination test (GAT) ในการตรวจหาความสำคัญทางคลินิกของแอนติเจนและแอนติบอดีของนิวโทรฟิวและอธิบายลักษณะ granulocyte specific alloantigen (NA1) และในปีเดียวกัน ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ HNA โดยการเปรียบเทียบการทดสอบจาก 3 วิธี ได้แก่ GAT, GCLT และ GIFT โดยพบว่าทั้ง 3 วิธีให้ผลการตรวจที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันและสามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว ในราคาที่ไม่แพง อย่างไรก็ตาม แต่ละวิธีก็มีข้อเสียในการตรวจ คือ GAT มีข้อจำกัดในการตรวจไม่พบในกรณีที่มี incubation period ยาวนาน ส่วน GIFT จะมีข้อเสียในการเกิด false-positive และวิธี GCLT จะมีข้อเสียตรงที่ไม่สามารถตรวจแอนติบอดีที่เป็น IgM ได้ (Bux J. 1996)

ต่อมาในปี ค.ศ. 2001 Zupanska B และคณะ ได้ประยุกต์ใช้วิธี GIFT ร่วมกับการใช้เครื่องนับเซลล์ชนิด flow cytometer มาใช้ในการศึกษาอัตราเสี่ยงต่อการเกิดแอนติบอดีต่อแอนติเจน HNA-1a และ HNA-1b ในหญิงตั้งครรภ์ จำนวน 1,038 ราย ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ neonatal neutropenia ในเด็กแรกเกิด ผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีจากแม่ที่เป็น HNA-1a/b จำนวน 548

ราย ให้ผลลบต่อแอนติเจนของลูกทุกราย ส่วนแอนติบอดีที่ได้มาจากแม่ชนิดที่เป็น HNA-1a/a และ HNA-1b/b นั้นให้ผลบวกกับแอนติเจนทุกตัว จึงสรุปได้ว่า HNA-1a/a และ HNA-1b/b เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดภาวะ neonatal neutropenia (Zupanska B *et al.* 2001)

ผลจากข้อจำกัดของการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยาที่ไม่สามารถใช้ในการแยกโฮโมไซกัส (homozygous) ออกจากเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้และจากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทำให้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหา HNA-1 มาเป็นการตรวจทางโมเลกุล (molecular technique) โดยเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจหา HNA ได้แก่ เทคนิค polymerase chain reaction-sequence based typing (PCR-SBT) และ polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) เทคนิคที่จัดว่าเป็นเทคนิคที่มีมาตรฐานสูงสุด ได้แก่ วิธี PCR-SBT ซึ่งสามารถหาลำดับเบสได้โดยใช้สีเรืองแสงมาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี รวมทั้งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ ซึ่งในระยะแรกได้อาศัยหลักการของการใช้สีเรืองแสง (fluorescent dye) 4 ชนิดมาต่อกับโมเลกุลของ primer เพื่อแยกไปทำปฏิกิริยาทั้ง 4 แล้วนำไปแยกโดยขบวนการ electrophoresis โดยชิ้น DNA แต่ละชนิดที่ได้จากปฏิกิริยานั้นจะมีขนาดไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับว่าจะหยุดสังเคราะห์ที่เบสตัวใดในสายนั้น นอกจากนี้ DNA สายที่มีการหยุดสังเคราะห์ที่เบสแต่ละตัวจะมีสีเรืองแสงที่ติดอยู่แตกต่างกันด้วย ดังนั้น เมื่อชิ้น DNA สายที่มีขนาดสั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมาเครื่องตรวจจับที่เป็นระบบแสงเลเซอร์จะจับความยาวช่วงคลื่นของสีเรืองแสงแต่ละตัวได้ และอาจจะบันทึกผลที่ออกมาว่าแถบ DNA แถบแรกนั้นเป็นแถบที่มีปลายเบสตัวใด และตรวจจับแถบถัดมาเรื่อย ๆ และเก็บข้อมูลไว้โดยคอมพิวเตอร์ เมื่อจบการทำ electrophoresis ก็สามารถอ่านข้อมูลลำดับเบสได้ทันทีเพื่อตรวจดูว่าลำดับเบสที่ได้ตรงกับ HNA ตัวใด ต่อมาในปัจจุบันการตรวจหา HNA โดยวิธี PCR-SBT นี้ได้อาศัยเครื่องมืออัตโนมัติ จึงสามารถหาลำดับของเบสภายหลังจากการขยายสัญญาณของยีนด้วยวิธี PCR ได้เลย

สำหรับเทคนิค polymerase chain reaction with sequence specific primer (PCR-SSP) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง โดยอาศัยวิธีการนี้ในปี ค.ศ. 1996 Hessner MJ และคณะได้นำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน NA กับผลของภูมิคุ้มกันของยีนในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาคโดยใช้การแยก NA1 และ NA2 ออกจากกันด้วยความแตกต่างของเบสที่ตำแหน่ง 141, 147, 227 และ 277 เขาได้สรุปให้เห็นว่าเทคนิค PCR-SSP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกชนิดของยีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตัวเดียว (single nucleotide polymorphism: SNP) และเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและความแม่นยำสูง (Hessner MJ *et al.* 1996) ดังนั้น ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเอาวิธี PCR-SSP มาใช้ในการวิจัยทางด้านนี้มากขึ้น

การตรวจหาชนิดของแอนติเจนของ neutrophil มีหลายวิธี แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียในการตรวจที่แตกต่างกัน การเลือกใช้วิธีที่เหมาะสมจึงขึ้นอยู่กับความต้องการใช้งานของแต่ละห้องปฏิบัติการ ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.2.1 วิธีการตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serology method) ได้แก่

1) วิธี Granulocyte Chemiluminescence Test (GCLT)

อาศัยหลักการ luminescence ที่เกิดจากปรากฏการณ์ของการปล่อยพลังงาน (emission process) ของอะตอมหรือโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยพลังงานในรูปแบบต่าง ๆ หรือปฏิกิริยาเคมี ทำให้เกิดการดูดรับพลังงานไว้ในโมเลกุล ส่งผลให้โมเลกุลของสารที่ถูกกระตุ้นไม่คงตัว และเกิดการคายความร้อนออกมาเมื่อกลับสู่สภาวะพื้นฐาน (ground state) พลังงานที่ถูกคายออกมาจะอยู่ในรูปของการเรืองแสงซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การประกบแผ่นฟิล์มเพื่ออ่านผลหรือการใช้เครื่องเฉพาะที่เรียกว่า luminometer ข้อดีของวิธี chemiluminescence คือ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติเพื่อให้เกิดความรวดเร็ว ความจำเพาะ และความไวในการตรวจที่สูงยิ่งขึ้น โดยวิธีการนี้จะลดขั้นตอนในการล้างลงไปเพราะเป็นการแยกตัวทดสอบโดยใช้ประจุแม่เหล็กไฟฟ้าแทน

ในปี ค.ศ. 1994 Lucas GF ได้นำวิธี GCLT มาตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil เพื่อเปรียบเทียบกับวิธี granulocyte immunofluorescence test (GIFT) และ granulocyte agglutination test (GAT) ในผู้ป่วย 213 ราย ที่มีความผิดปกติของ neutrophil ผลการทดลองสรุปได้ว่าวิธี GCLT ให้ผลการตรวจไม่แตกต่างจาก GIFT และ GAT ทั้ง 3 วิธีสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีของ neutrophil ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับความสะดวกและความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ แต่ส่วนใหญ่มักใช้ร่วมกันทั้ง 2 วิธี (Lucas GF. 1994) ผลงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Bux J และ Chapman J ซึ่งได้จากการประชุมปฏิบัติการครั้งที่ 2 ของการประชุม International Granulocyte Serology Workshop โดยการเปรียบเทียบผลการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil ด้วยเทคนิค GIFT, GAT และ MIAGA จากผลการทดลองของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการประชุม จำนวน 13 แห่ง พบว่า 2 ใน 3 ของห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมการประชุมสามารถใช้วิธี GIFT เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจน HNA-1 ได้อย่างถูกต้อง ในขณะที่ห้องปฏิบัติการบางแห่งสามารถตรวจได้ด้วยวิธี GAT ผู้วิจัยสรุปว่าควรนำทั้งสองเทคนิคมาใช้ควบคู่กันจึงจะดีที่สุด (Bux J and Chapman J. 1997)

2) วิธี Granulocyte Immunofluorescence Test (GIFT)

เป็นการประยุกต์ใช้หลักการของเทคนิค indirect immunofluorescence มาพัฒนาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจนของ neutrophil โดยในปี ค.ศ. 1977 Vergheugt FW และ

คณะ ได้พัฒนาเทคนิคนี้ขึ้นมา และชี้ให้เห็นถึงปัญหาของการประยุกต์ใช้เทคนิค GIFT ที่เกิดจากความไม่จำเพาะของสารเรืองแสงบนผิว granulocyte ที่ยึดเกาะกับผิวเซลล์ไม่แน่น อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้แนะนำแนวทางในการแก้ไขด้วยการรักษาสภาพของเซลล์ด้วยสาร paraformaldehyde ก่อนการทดลอง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำ (Verheugt FW *et al.* 1977)

ต่อมาในปี ค.ศ. 1996 Bux J ได้ใช้วิธี GIFT และ GAT ในการตรวจหาแอนติบอดีของ neutrophil ทั้งชนิด IgG และ IgM ในผู้ป่วยภาวะ AIN ระยะต่าง ๆ แม้ว่าวิธี GIFT จะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และมีความจำเพาะสูง แต่มีข้อเสียคือสามารถเกิดผลบวกปลอมได้ (Bux J. 1996) และในปี ค.ศ. 1998 Bux J ก็ได้ใช้วิธี GIFT ในการตรวจวินิจฉัยทางคลินิกของภาวะ AIN ในเด็กทารกที่มีอายุน้อยกว่า 3 ปี จำนวน 240 ราย อีกครั้ง ผลการศึกษาสามารถตรวจพบ antineutrophil antibody ได้ในผู้ป่วยทั้ง 240 ราย (100%) ผู้วิจัยชี้ให้เห็นว่าการใช้วิธี GIFT เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อ neutrophil เป็นวิธีที่เหมาะสมและน่าเชื่อถือ (Bux J *et al.* 1998) จึงนำมาสู่การศึกษาอีกหลายฉบับ เช่น การศึกษาของ Bruin M และคณะ เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อภาวะ AIN ในผู้ป่วยเด็กจำนวน 28 ราย โดยใช้เทคนิค indirect granulocyte immunofluorescence ผลการศึกษาพบว่า ในผู้ป่วยกลุ่ม primary AIN ตรวจพบแอนติบอดี 3 ชนิด ได้แก่ anti-NA1 จำนวน 16 ราย anti-NA2 จำนวน 2 ราย anti-FcγRIIIB จำนวน 1 ราย และไม่สามารถสรุปได้อีก 2 ราย ในขณะที่ผู้ป่วยกลุ่ม secondary AIN จำนวน 7 ราย ตรวจพบเฉพาะ anti-FcγRIIIB เพียงชนิดเดียว (Bruin M *et al.* 2005) และงานวิจัยของ Zupanska B และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 ได้พัฒนาใช้วิธี GIFT ร่วมกับเครื่องนับเซลล์ชนิด flow cytometer เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของ anti- HNA-1a และ anti-HNA-1b ในหญิงตั้งครรภ์ จำนวน 1,038 ราย ที่เป็นสาเหตุทำให้ทารกเกิดภาวะ ANN ผลการทดลองพบว่า anti-HNA-1a และ anti-HNA-1b เป็นสาเหตุก่อให้เกิดภาวะ ANN ในทารกแรกคลอดทั้งหมด (Zupanska B *et al.* 2001)

3) วิธี Monoclonal Antibody Immobilization of Granulocyte Antigen (MAIGA)

การนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจแอนติเจนของ neutrophil มีใช้ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1993 โดย Bux J และคณะ จากการใช้ CD16 เป็นโมโนโคนัลแอนติบอดีตัวแรก (Bux J *et al.* 1993; Zupanska B *et al.* 2001) ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 Lucas G และคณะ ได้นำวิธี MAIGA มาใช้ในการทดสอบหามาตรฐานของการตรวจในการประชุมเชิงปฏิบัติการ Granulocyte Immunology Workshop ครั้งที่ 4 โมโนโคนัลแอนติบอดีที่ใช้ตรวจ ได้แก่ CD11/18, CD16 และ CD177 (Lucas G *et al.* 2002) ผลการทดสอบพบว่า วิธีนี้มีความจำเพาะสูงมาก แต่เนื่องจากวิธีนี้มีขั้นตอนการทำที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่ค่อยนิยมนำมาตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไป

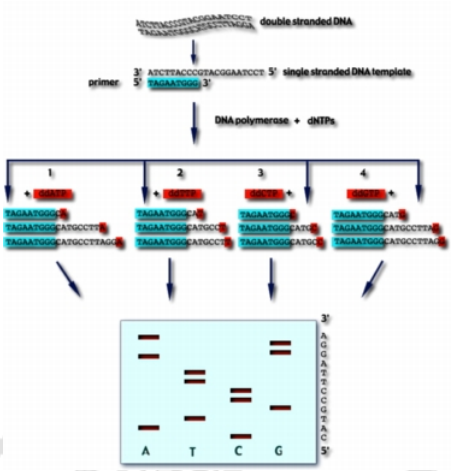
จากรายงานที่ผ่านมาจึงสรุปได้ว่า การตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีของ neutrophil ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ทางวิธี serology นิยมใช้วิธี GAT และ GIFT มากกว่าวิธี MAIGA แต่เนื่องจากวิธีทาง serology ไม่สามารถแยก homozygous กับ heterozygous ออกจากกันได้ ดังนั้น การศึกษาถึงระดับยีนของแอนติเจนของ neutrophil โดยใช้วิธีทาง molecular จึงได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากสามารถบอกได้อย่างละเอียดว่ายีนอยู่ในตำแหน่งไหนและมีการเรียงตัวของลำดับเบสอย่างไร ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

2.2.2 วิธีการตรวจทางอณูชีวโมเลกุล (molecular method)

1) Polymerase Chain Reaction-Sequence Based Typing (PCR-SBT)

เป็นการหาลำดับเบสโดยใช้สีเรืองแสง (fluorescent dye) มาติดฉลากแทนสารกัมมันตรังสี ซึ่งสามารถตรวจสอบผลได้ทันทีโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ โดยใช้หลักการติดฉลากเบสของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน แล้วนำเบสเหล่านี้เข้าไป (incorporate) ในสายดีเอ็นเอใหม่โดยใช้ DNA polymerase จากนั้นจึงนำไปเคลื่อนผ่านเจลที่มีความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าด้วยหลักการ electrophoresis ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกตรวจจับด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงแล้วแปลงเป็นสัญญาณดิจิตอล ส่งไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยขบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นอย่างอัตโนมัติภายใต้การทำงานของเครื่อง DNA Sequencer สามารถอ่านข้อมูลลำดับเบสทำให้ทราบว่าเป็น HNA ชนิดใดได้ทันที (รูปที่ 2.2)

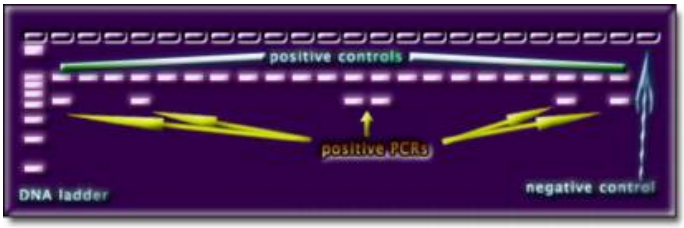
จากงานวิจัยที่ผ่านมา การนำเทคนิค PCR-SBT มาใช้ในการตรวจหาชนิดของ HNA ยังมีใช้น้อย ส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษาลำดับเบสของ HNA-1 เท่านั้น (Steffensen R *et al.* 1999; Matsuo K *et al.* 2000) อย่างไรก็ตาม ผลงานวิจัยล่าสุดที่ชี้ให้เห็นถึงความก้าวหน้าของการศึกษาทางด้านความหลากหลายของแอนติเจน HNA มาจากการศึกษา whole genome sequencing (WGS) data โดยการใช้ next-generation sequencing technology เพื่อตรวจหา HNA-1 ถึง -5 เปรียบเทียบกับผลการตรวจโดยวิธี PCR-SSOP, PCR-SSP และ PCR-RFLP ซึ่งพบว่า next-generation sequencing สามารถให้ผลการตรวจที่ถูกต้องและรวดเร็ว (Chu HT *et al.* 2013)



รูปที่ 2.2 หลักการการตรวจหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing based typing (SBT) (Velickovic Z. 2010 : Online) (Velickovic Z. 2010)

2) Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primer (PCR-SSP)

เป็นเทคนิคของการเพิ่มปริมาณ DNA โดยการใช้ primer ที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันของแต่ละ allele เข้าไปจับกับ DNA ถ้า primer จับกับ target DNA ได้ ก็จะมีการเพิ่มปริมาณของ DNA ขึ้นมา และภายหลังการทำ electrophoresis เพื่อตรวจผลจากแผ่นเจลก็จะพบ PCR product ที่มีขนาดที่จำเพาะกับแต่ละ allele ได้ แต่ถ้า primer ที่ใช้ไม่จำเพาะกับ target DNA ก็จะจับกันไม่ได้และจะไม่มีการเพิ่มปริมาณของ PCR product ขึ้นมา ทำให้ไม่มีการปรากฏของแบน ภายหลังจากการทำ electrophoresis (รูปที่ 2.3) เนื่องจากเทคนิค PCR-SSP เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง ดังนั้น จึงเป็นที่นิยมในการนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจน HNA กันอย่างแพร่หลาย (Kissel K *et al.* 2000; Sachs UJ *et al.* 2005; Han TH *et al.* 2006; Han TH and Han KS. 2006; de La Vega Elena CD *et al.* 2008; Norcia AM *et al.* 2009)



รูปที่ 2.3: หลักการตรวจหาแอนติเจนที่จำเพาะโดยวิธี PCR-SSP (Velickovic Z. 2010 : Online) (Velickovic Z. 2010)

ในปี ค.ศ. 1996 Hessner HJ และคณะ ได้นำวิธี PCR-SSP ไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน NA กับผลของภูมิคุ้มกันของยีนในตัวอย่างเลือดของผู้บริจาค โดยใช้การแยก NA1 และ NA2 ออกจากกันด้วยความแตกต่างของเบสที่ตำแหน่ง 141, 147, 227 และ 277 และได้สรุปให้เห็นว่าเทคนิค PCR-SSP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการแยกชนิดของยีนที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของเบสเพียงตัวเดียว (single nucleotide polymorphism: SNP) และเป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วและความแม่นยำสูง (Hessner MJ *et al.* 1996) ต่อมาได้มีการนำเทคนิค PCR-SSP มาใช้ในการศึกษาการกระจายตัวของยีน HNA ในเชื้อชาติต่าง ๆ อย่างแพร่หลาย (Kissel K *et al.* 2000; Abid S *et al.* 2001; Flesch BK *et al.* 2002; de La Vega Elena CD *et al.* 2008; Norcia AM *et al.* 2009; Changsri K *et al.* 2014) รวมทั้งนำมาใช้ร่วมกับวิธีอื่น ๆ เพื่อหาสาเหตุของการเกิดภาวะ neutropenia ในผู้ป่วย เช่น จากงานวิจัยของ Han TH และคณะ ในปี ค.ศ. 2006 ที่ได้ศึกษาหาแอนติบอดีในซีรัมมารดาและทารกที่มีภาวะ ANN ร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี mixed passive hemagglutination assay (MPHA) และหาชนิดของแอนติเจน neutrophil ทั้งของมารดาและทารกโดยวิธี PCR-SSP พบว่า ในทารกจะพบทั้งแอนติเจน HNA-1a และ HNA-1b ส่วนในมารดามีเฉพาะแอนติเจน HNA-1b และผลการตรวจหาแอนติบอดีในซีรัมของทั้งคู่พบ anti-HNA-1a ทั้งนี้เนื่องมาจากมารดาไม่มีแอนติเจนดังกล่าว เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากลูกจึงสร้าง anti- HNA-1a ขึ้นมา และเมื่อตั้งครรภ์ครั้งต่อไป แอนติบอดีที่มีอยู่ในเลือดแม่ (IgG) จึงผ่านทางรกมาจับกับ neutrophil ของลูก ทำให้ neutrophil ของลูกถูกทำลาย (Han TH *et al.* 2006)

2.3 การกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1

รายงานการศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA มีความสำคัญต่อกระบวนการจัดทำฐานข้อมูลผู้บริจาคเพื่อใช้ในการคัดเลือกผู้บริจาคให้แก่ผู้ป่วย การคัดเลือกเซลล์เพื่อใช้ในการตรวจคัดกรอง และยังสามารถใช้ในการทำนายโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะ alloimmunization ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น รายงานวิจัยในปี ค.ศ. 2000 ของ Kissel K และคณะ ที่ศึกษาเกี่ยวกับความถี่ของ HNA-1a, HNA-1b และ HNA-1c ในประชากรประเทศแอฟริกา จำนวน 99 ราย ชาวอเมริกา จำนวน 56 ราย ชาวกานา จำนวน 27 ราย และชาวจีน จำนวน 138 ราย คณะผู้วิจัยพบว่า ประชากรในประเทศแอฟริกาและอเมริกาจะพบความถี่ของ HNA-1b ได้บ่อยกว่า HNA-1a ซึ่งตรงข้ามกับชาวจีนที่พบความถี่ของ HNA-1a มากกว่า HNA-1b นอกจากนี้ ยังพบความถี่ของ HNA-1c ในประชากรประเทศแอฟริกาและอเมริกา อีกด้วย โดยพบว่าในคนที่ HNA-1c positive จะพบ HNA-1b positive ด้วยเช่นกัน และจากการค้นพบครั้งนี้จึงสนับสนุนความคิดที่ว่า HAN-1c มีผลมาจากการกลายพันธุ์ของ HNA-1b (Kissel K *et al.* 2000) และจากรายงานวิจัย

เกี่ยวกับความถี่ของยีน HNA-1 ในชนกลุ่มน้อยของไต้หวัน ในปี ค.ศ. 2001 โดย Chu CC และคณะ ทำให้พบว่าประชากรที่ศึกษาจะมีการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1 null มากที่สุดในชนกลุ่ม Ami (19.8%) รองลงมาคือชนกลุ่ม Hakka (5.7%), ชนกลุ่ม Puyuma (3.5%) และชนกลุ่ม Rukai (3.2%) ตามลำดับ ส่วน HNA-1a นั้นพบความถี่ใกล้เคียงกัน ยกเว้น ความถี่ของ HNA-1b ที่พบได้น้อยในชนกลุ่ม Ami และ Puyuma (25.5% และ 27.0% ตามลำดับ) และจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าไม่พบความถี่ของ HNA-1c ในประชากรไต้หวัน (Chu CC *et al.* 2001)

การศึกษาความถี่ของแอนติเจน HNA-1 ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ มีรายงานอย่างต่อเนื่องต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Moritz E และคณะ จึงได้รวบรวมรายงานการตรวจพบความถี่ของ HNA ทั้ง 5 ระบบ ในแต่ละเชื้อชาติ และชี้ให้เห็นว่าการกระจายตัวของ HNA แต่ละระบบในแต่ละเชื้อชาตินั้นมีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3) (Moritz E *et al.* 2009) เช่น การกระจายตัวของ HNA-1a ในประชากรของประเทศแถบเอเชีย พบได้ประมาณ 44 - 90% โดยพบการกระจายตัวในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ดังนี้ ชาวจีน 90% ชาวอินเดียในทวีปเอเชีย (Asian Indians) 44% ญี่ปุ่น 88% และเกาหลี 78% สำหรับยีน HNA-1b นั้น พบว่ามีการกระจายตัวประมาณ 51 - 83% โดยพบในชาวจีน 52% ชาวอินเดียในทวีปเอเชีย 83% ญี่ปุ่น 51 - 61% และเกาหลี 75% สำหรับยีน HNA-1c นั้นมีการรายงานการตรวจพบได้น้อย ส่วนใหญ่เป็นรายงานการตรวจพบในชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในทวีปเอเชีย (16%) และชาวเกาหลี (< 1%) และได้สรุปให้เห็นว่าการกระจายตัวของ HNA-1 ในประชากรชาวเอเชียนั้นมีความใกล้เคียงกัน และพบว่ามีความแตกต่างจากชาวอัฟริกันและชาว Caucasian อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังชี้ให้เห็นว่าผลจากการกระจายตัวที่แตกต่างกันของ HNA ในแต่ละเชื้อชาติทำให้โอกาสที่ประชากรแต่ละเชื้อชาติจะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจน HNA แต่ละระบบแตกต่างกันไปด้วย

ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 Xia W และคณะ ได้ทำการศึกษาความถี่ของยีน HNA ในประชากรจีนเชื้อสายฮั่นที่อาศัยอยู่ในเมืองกว่างโจว จำนวน 493 ราย โดยใช้วิธี PCR-SSP เพื่อใช้แยกชนิดของยีนตั้งแต่ HNA-1 ถึง HNA-5 แล้วนำผลการวิจัยไปเปรียบเทียบกับประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ ผลการศึกษาพบความถี่ของยีน HNA-1a (0.667) มากเป็นสองเท่าของ HNA-1b (0.333) แต่ไม่พบความถี่ของ HNA-1c (Xia W *et al.* 2011) เช่นเดียวกับความถี่ของยีน HNA-3 ที่พบความถี่ของ HNA-3a มากกว่า HNA-3b ในขณะที่ระบบที่ 2 นั้น พบการแสดงออกของ C-allele มากสุดถึง 69% ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจำนวน HNA-2a-positive neutrophil ในประชากรบางกลุ่ม ส่วน HNA ในระบบที่ 4 นั้นไม่แสดงผลให้เห็นในการแสดงออกของยีน HNA-4bb เลย และในทางตรงกันข้ามก็จะพบการแสดงออกของยีน HNA-5bb ได้ 2.43% ในประชากรกลุ่มนี้ นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าเมื่อเปรียบเทียบความถี่ของยีนกับชนผิวขาวสามารถนำมาช่วยในการประเมิน

การตรวจพบ anti-HNA alloimmunization และประเมินการเกิดภาวะ alloimmune neutropenia และ TRALI ในคนจีนได้ด้วย

ตารางที่ 2.3 ความถี่ของแอนติเจน HNA ในประชากรเชื้อชาติต่าง ๆ (Moritz E *et al.* 2009)

ประชากร	HNA-1a	HNA-1b	HNA-1c	HNA-1null	HNA-2a	HNA-3a	HNA-4a	HNA-5a
Africans	46 – 66	78 – 84	23 – 31	4	98	NT	NT	88
Chinese	90	52	0	0 - 0.2	99	NT	NT	65
Asian Indians	44	83	16	NT	NT	NT	NT	NT
Japanese	88	51 - 61	0	<0.4	89 - 99	NT	NT	NT
Koreans	78	75	<1	NT	86	NT	99	96
Europeans	52 - 54	87 - 89	5 - 7	0.2 – 0.8	87 - 97	89 - 99	96	96
North Americans	56 - 62	89	5	NT	97	NT	NT	96
Brazilian	100	83	11	NT	97	86 - 95	96	91
Brazilian Indians	83	36	0	NT	NT	NT	100	96

NT: not tested

สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการกระจายตัวของแอนติเจน HNA เพียงหนึ่งฉบับ โดย Changsri K และคณะ ซึ่งได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของแอนติเจน HNA ระบบที่ 1, 3, 4 และ 5 ในกลุ่มผู้บริจาคเลือดชาวไทยจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 300 ราย โดยใช้วิธี PCR-SSP สำหรับตรวจหาแอนติเจนระบบที่ 1, 3 และ 4 และใช้วิธี PCR-RFLP สำหรับตรวจหาแอนติเจนระบบที่ 5 ผลการศึกษาพบการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1b ในกลุ่มผู้บริจาคเลือดชาวไทย เท่ากับ 0.53 (273/300) ซึ่งสูงกว่าการกระจายตัวของ HNA-1a ($p < 0.001$) ซึ่งพบเพียง 0.47 (255/300) ในขณะที่ HNA-1c นั้นสามารถตรวจพบได้น้อยมาก (3/300) (Changsri K *et al.* 2014) การศึกษานี้คณะผู้วิจัยชี้ให้เห็นว่าการกระจายตัวของแอนติเจน HNA-1a และ HNA-1b ในประชากรชาวไทยมีความคล้ายคลึงกับประชากรชาวเยอรมันและชาวตุรกี (Hauck B *et al.* 2011) และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) กับความถี่ที่พบในประชากรชาวเอเชีย (Kissel K *et al.* 2000; Han TH and Han KS. 2006) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังสรุปว่าประชากรชาวไทยน่าจะมีความไวรับต่อการเกิดภาวะ HNA-1b alloimmunization ได้มาก เช่นเดียวกับความถี่ของแอนติเจน HNA-5a ซึ่งพบในชาวไทยได้

คล้ายคลึงกับที่พบในชาวเยอรมันและชาวตุรกี ซึ่งพบว่ามีความถี่ที่น้อยกว่าในชาวเกาหลีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในขณะที่ความถี่ของแอนติเจน HNA-3a ในประชากรไทยนั้นพบได้น้อยกว่า HNA-3b และมีความแตกต่างจากความถี่ที่พบในประชากรเชื้อชาติอื่น ๆ ด้วย (Kissel K *et al.* 2000; Han TH *et al.* 2006; Han TH and Han KS. 2006; Hauck B *et al.* 2011) และในทางตรงข้าม คณะผู้วิจัยได้รายงานให้เห็นถึงความถี่ของแอนติเจน HNA-4a ซึ่งพบในกลุ่มตัวอย่างผู้บริจาคเลือดชาวไทยมีความคล้ายคลึงกับที่พบในชาวเกาหลี (Han TH and Han KS. 2006) และพบได้สูงกว่าในชาวเยอรมันและตุรกีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ