

บทความพิเศษ

RhDel

สุภัตตรา มิถุนดี

ภาคบริการโลหิตแห่งชาติที่ 12 จังหวัดสงขลา

หมู่โลหิตระบบ Rh เป็นหมู่โลหิตที่มีความสำคัญรองลงมาจาก ระบบ ABO มีการรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ.1939 โดย Levine และ Stetson พบแอนติบอดีในซีรัมหญิงคลอดบุตร และบุตรเสียชีวิตขณะคลอดเนื่องจากเม็ดโลหิตแดงแตกทำลายอย่างรุนแรง (erythroblastosis fetalis) ซีรัมของหญิงดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับเม็ดโลหิตแดงของสามีได้ด้วย แอนติเจน Rh เป็นแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงของคนที่เหมือนกับแอนติเจนบนเม็ดโลหิตแดงของลิง Rhesus โดยที่ Landsteiner และ Wiener เป็นผู้ค้นพบว่าการถ่ายสร้างแอนติบอดี ต่อเม็ดโลหิตแดงของลิง Rhesus สามารถทำให้เม็ดโลหิตแดงของคนส่วนใหญ่จับกลุ่มได้ คนเหล่านี้จึงจัดว่าเป็นหมู่โลหิต Rh บวก ปัจจุบันเมื่อกล่าวถึงหมู่โลหิต Rh บวก หมายถึงบนผิวเม็ดโลหิตแดงนั้นมี D-antigen อยู่ ส่วนหมู่โลหิต Rh ลบ หมายถึงการไม่มี D-antigen บนผิวเม็ดโลหิตแดง RhD ลบ พบในคนผิวขาวร้อยละ 15 ในขณะที่คนไทยพบเพียงร้อยละ 0.3 เท่านั้น¹ ดังนั้นปัญหา RhD ลบ ในคนผิวขาวเป็นเรื่องการสร้าง anti-D ซึ่งถ้าเป็นหญิงในวัยเจริญพันธุ์อาจทำให้เกิด hemolytic disease of the fetus and the newborn (HDFN) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเด็ก ส่วนในคนไทยนอกจากปัญหา HDFN แล้วยังมีปัญหาคารกโลหิตที่เป็น Rh ลบ ให้ผู้ป่วยได้ยากเมื่อต้องได้รับโลหิตด้วย

แอนติเจน D เป็นแอนติเจนที่มี immunogenicity สูงกว่าแอนติเจนตัวอื่นในระบบเดียวกัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 417 ตัว สามารถกระตุ้นให้ผู้ไม่มีแอนติเจน D (RhD ลบ) สร้างแอนติบอดี (anti-D) ได้สูงถึงร้อยละ 50-75 จากการได้รับโลหิต RhD บวก เพียง 10 mL นับเป็นปัญหาสำคัญของการเกิด alloimmunization และ HDFN นอกจากนี้ยีน Rh D ซึ่งกำหนดการสร้างแอนติเจน D ยังมีความหลากหลาย (polymorphism) มีการศึกษาค้นพบการเปลี่ยนแปลงของยีนเกิดอัลลีลใหม่ๆ มากกว่า 200 อัลลีล ในปัจจุบันการทดสอบแอนติเจน D ทางห้องปฏิบัติการธนาคารเลือด ทำโดยการทดสอบด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีคือนำเม็ดโลหิตแดงมาทำปฏิกิริยากับ monoclonal anti-D ทดสอบที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิ 37°C และที่ antiglobulin test ถ้าให้ผลลบสรุป

ว่าเป็น RhD ลบ แต่ถ้าให้ผลบวกที่อุณหภูมิห้องสรุปว่าเป็น RhD บวก หากให้ผลบวกที่ antiglobulin test สรุปว่าเป็น weak D สำหรับ RhDel ทุกรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1980 เป็นลักษณะ D บวก พิโนทัยป์แบบอ่อนมากในหมู่โลหิตระบบ Rh ให้ปฏิกิริยาเป็น RhD ลบ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีเช่นเดียวกับ RhD ลบ ที่แท้จริง ต้องตรวจด้วยเทคนิค adsorption and elution จึงจะสามารถแยก RhDel และ RhDลบ ได้ โดย RhDel จะให้ผลบวกกับเทคนิค adsorption - elution แต่ RhD ลบจะให้ผลลบ นอกจากนี้ส่วนใหญ่ RhDel² ไม่สร้าง anti-D เมื่อได้รับโลหิตที่เป็น RhD บวก ดังนั้นจึงสามารถรับโลหิต RhD บวก ได้อย่างปลอดภัย แต่เมื่อให้เลือด RhDel แก่ผู้ป่วยที่เป็น RhD ลบ ส่วนโลหิต RhDel สามารถกระตุ้นให้ผู้ป่วยสร้าง alloimmune anti-D ได้³⁻⁶

Rh gene

Rh gene อยู่บนโครโมโซม (autosomal chromosome) คู่ที่ 1⁷⁻⁹ ตามแนวคิดของ Fisher-Race อธิบายว่า ยีนที่ควบคุมแอนติเจนหลัก อยู่ตำแหน่งที่ใกล้ชิดกันมาก (three cross link loci) การถ่ายทอดจึงเป็นแบบไปเป็นชุดเดียวกัน (gene complex) แต่ละโลคัสประกอบด้วยอัลลีลของยีนเด่นร่วม (codominant allelic genes) ควบคุมการสร้างแอนติเจนแต่ละชนิดตามชนิดของยีนแอนติเจนแต่ละชนิดจำเพาะต่อแอนติบอดีต่างชนิดกัน (multiple specificities) ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันว่ามียีน D (RHD) และยีน CcEe (RHCE) เพียง 2 loci ทั้งนี้แต่ละยีนจะมี 10 exons (Figure 1) ควบคุมการสร้างแอนติเจน แต่ละโลคัสจะมีอัลลีลคู่กัน โดยอัลลีล d ไม่สร้างแอนติเจน เนื่องจากการขาดหายไปของยีน D (gene deletion) หรือมีการกลายพันธุ์เนื่องจากการเพิ่มของลำดับเบสดีเอ็นเอหนึ่งตัว เกิด frame shift และทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีน ส่วนโลคัสที่ 2 จะมีการผลิตโปรตีนสองชนิดซึ่งมีขนาดไม่เท่ากัน เนื่องจากกระบวนการ alternative splicing โดยโปรตีน C/c เป็นโปรตีนสายสั้นใช้ 7 exons และโปรตีน E/e เป็นโปรตีน สายยาวใช้ 10 exons และมีอัลลีล 4 แบบ คือ Ce, cE, ce หรือ CE

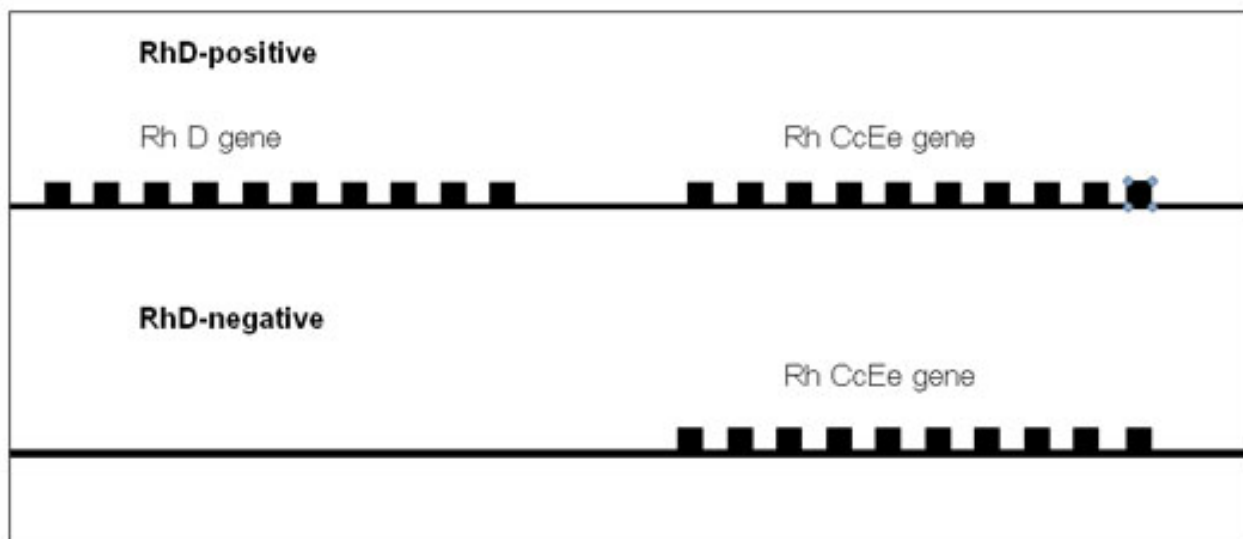


Figure 1. Rh gene organization for Rh D-positive and Rh D-negative individuals. The Rh CcEe gene is composed of 10 exons. The Rh D gene appears to have a similar organization. This figure, the Rh D gene is absent from the vast majority of Rh D-negative individuals at least within Caucasian populations. This figure was adapted from a previous study.¹⁰

ความผิดปกติของยีน D

Weak D เป็นลักษณะแอนติเจน D แบบอ่อน เม็ดโลหิตแดงมีปริมาณหรือคุณภาพของแอนติเจน D ที่ต้องใช้เทคนิคแอนติโกลบูลินช่วย จึงจะสามารถตรวจพบได้ แต่ได้น้อยประมาณต่ำกว่าร้อยละ 1 เมื่อใดที่บุคคลเหล่านี้มีการสร้าง alloimmune anti-D จะเรียกคนกลุ่มนี้ว่า D-variant หรือ partial D

Weak D มีสาเหตุการเกิด 3 แบบ⁹ คือ

1. ยีนแอนติเจน D แบบอ่อน (Genetic Weak D)

Race, Sanger และ Lawler รายงานเมื่อปี ค.ศ. 1948 โดยแสดงการได้รับถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติซึ่งเป็นยีนแอนติเจน D แบบอ่อน (weak D gene) จากพ่อแม่และแอนติเจน D ครบสมบูรณ์แต่มีจำนวนน้อย สามารถพบในคนผิวดำได้บ่อยกว่าผิวขาว เกิดปฏิกิริยากับ anti-D อ่อนมาก ต้องใช้เทคนิคแอนติโกลบูลินเสริมปฏิกิริยา เนื่องจากแอนติเจน D ครบสมบูรณ์ จึงไม่สามารถสร้าง anti-D

2. ผลร่วมของยีน (Gene interaction)

Cappellini, Dunn และ Turri รายงานในปี ค.ศ. 1995 โดยพบว่าเมื่อยีน D และยีน C อยู่บนโครโมโซมแต่ละข้าง (trans effect) เช่น D₁Ce/dCe (R₁r') และ Dce/dCe (R₀r') แม้ว่าปริมาณของแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงจะปกติแต่การเรียงตัวของแอนติเจน C จะมีผลต่อการแสดงออกของแอนติเจน D เช่นเดียวกับกลุ่ม genetic weak D เนื่องจากแอนติเจน D ครบสมบูรณ์จึงไม่สามารถสร้าง anti-D ได้

3. ส่วนประกอบของแอนติเจน D ไม่ครบ (D mosaic or partial D)

Wiener และ Unger ได้รายงานเมื่อปี ค.ศ. 1959 โดยอธิบายว่าแอนติเจน D แบบสมบูรณ์ (complete D antigen) ประกอบด้วยแอนติเจนส่วนย่อย (D antigen mosaic) 4 ส่วนคือ RhA, RhB, RhC และ RhD คนที่ขาดแอนติเจนส่วนใดส่วนหนึ่งไป เช่น ขาด RhB (RhAbCD) เมื่อได้รับเลือดแอนติเจน D แบบสมบูรณ์ ก็จะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อแอนติเจนส่วนย่อยที่ขาดหายไป จากการศึกษากิจกรรมระดับดีเอ็นเอพบว่ายีน RhD ซึ่งมี 10 exons นั้น บาง exons ถูกแทนที่โดย exons จากยีน RHCE (gene conversion) ทำให้ลำดับของยีนและโปรตีนเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนก็จะเปลี่ยนไปโดยพบว่าแอนติเจน (epitope) ของแอนติเจน D ขาดหายไปบางส่วนเรียกว่า partial D บางครั้งอาจเกิดจากยีนขาดหาย (deletion) หรือ กลายพันธุ์ (mutation) ได้ ปัจจุบันเมื่อพิจารณาจากลำดับของ exons ในคน partial D สามารถจำแนกออกเป็นแบบ (category) ต่างๆ ได้⁹ บาง categories สามารถจำแนกย่อยออกเป็น subcategories ได้เช่น category III และ IV เป็นต้น เมื่อใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจนส่วนต่างๆ ของแอนติเจน D (anti-epD1 ถึง anti-epD9) พบว่าแต่ละ category จะมีรูปแบบการทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแตกต่างกัน ในอดีตเรียกความผิดปกตินี้ว่า D mosaic หรือ D variant แต่ปัจจุบันยกเลิกให้เรียกเป็น “partial D”

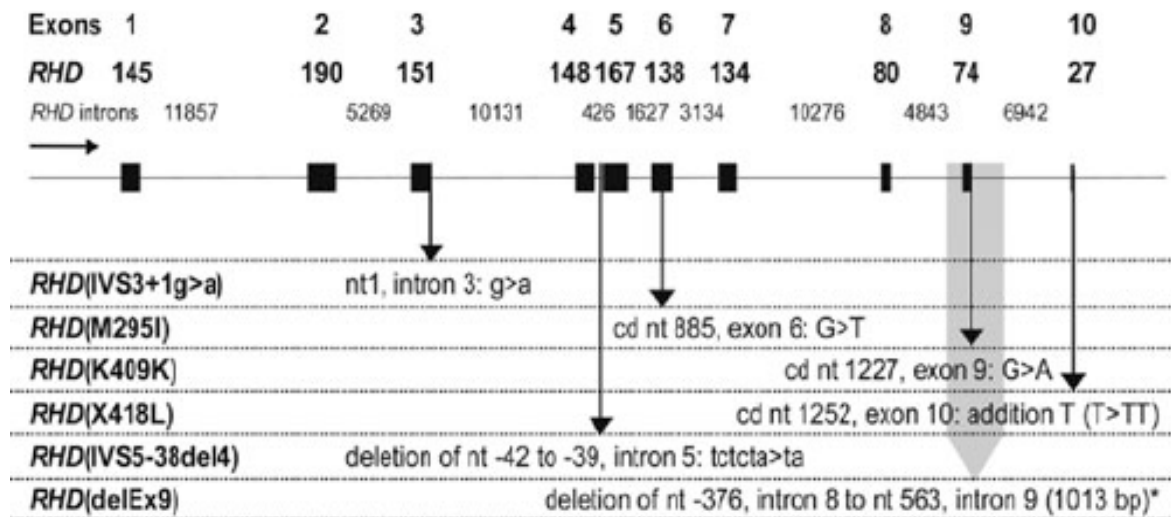


Figure 2. Molecular background of known Del alleles. This figure was adapted from a previous study.¹⁹

RhDel

RhDel (D-elute) เป็น partial D ชนิดหนึ่งที่มีลักษณะฟีโนไทป์เป็น D ลบ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีจะให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ RhD ลบที่แท้จริง ต้องตรวจด้วยเทคนิค adsorption - elution จึงจะสามารถแยก RhDel และ RhD ลบ ได้ ซึ่งการทดสอบด้วยเทคนิค adsorption and elution นั้นไม่ได้ทำในงานประจำของห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดทั่วไป จึงไม่สามารถแยก RhDel ออกจาก RhD ลบ ได้ด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีดังกล่าว ปัจจุบันมีการศึกษาความถี่และศึกษาระดับโมเลกุลของยีน RhDel ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่า RhDel สามารถพบได้ทั่วไป โดยในจีนและญี่ปุ่นพบกว่าร้อยละ 10-30 ในคนไทยมีรายงานโดย Srijinda และคณะในปี 2012 ว่าพบร้อยละ 19¹¹ ในผู้ที่ เป็น RhD ลบ แต่พบอัตราความถี่น้อยมากในยุโรปทั้งนี้ ยังไม่มีการรายงาน Del ฟีโนไทป์ในแอฟริกัน สาเหตุที่ยีน RhDel ไม่มีการสร้างโปรตีนแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงนั้น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีน RhD ที่ผิดปกติไปซึ่งเกิดจากการบรรจบกันของหลายหลายกระบวนการ^{5,12-17} และจากการศึกษาที่ผ่านมาสาเหตุที่พบบ่อย (Figure 2) ได้แก่

Splice-site mutation : การเกิดมิวเตชันแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งการตัดต่อระหว่าง exon และ intron เช่น RHD(K409K)¹⁸ เป็นลักษณะอัลลีลที่พบว่ามีความถี่มากที่สุดไนฟีโนไทป์ Del ในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเกิดจากการบรรจบกัน splice-site mutation เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งสุดท้ายของ exon9 ของ RhD ยีนโดยเปลี่ยนจาก G เป็น A แต่กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนยังคงเป็น lysine เช่นเดิม ซึ่ง RhD (K409K) มีการรายงานพบความถี่ 1 : 110 และ

1 : 9091 ในประชากรจีนและเยอรมันตามลำดับ,^{13,18} RHD (IVS3 + 1G>A) เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ใน intron ที่ 3 ของ RhD ยีนนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 เปลี่ยนจาก G เป็น A, RHD (IVS1 + 1 G>A) เกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ intron ที่ 1 นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 เปลี่ยนจาก G เป็น A

Missense mutation : การเกิดมิวเตชันแล้วมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน เช่น RHD (M295I) เกิดจาก exon ที่ 6 ของ RhD ยีน นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 885 เปลี่ยนจาก G เป็น T

Frameshift mutation : การเกิดมิวเตชันแล้วทำให้เกิดจุดยุติการแปลรหัสพันธุกรรมหรือการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน เช่น RHD (X418L) เกิดจาก exon ที่ 10 ของ RhD ยีน นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1252 เปลี่ยนจาก T เป็น TT โดยมี T เพิ่มอีก 1 ตัว

Partial deletion of RhD gene : มีการขาดหายไปของยีน RhD (partial deletion of RhD gene) เช่น RHD (del Ex8) เกิดจากนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป 995-bp เริ่มตั้งแต่ intron 7, exon 8 และ intron 8, RHD(IVS5-38del4) เกิดจาก Intron 5 ของ RhD ยีน นิวคลีโอไทด์ขาดหายไป 4-bp เริ่มจากตำแหน่งที่ 38

RHD-CE-D hybrid allele : การเกิด RHD-CE-D hybrid เช่น RHD (1-9)-CE, RHD-CE (4-9)-D, RHDCE (2-5)-D

สรุป

RhDel หรือ D-elute เป็น partial D ที่มีลักษณะฟีโนไทป์เป็น D ลบ เมื่อตรวจด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีในงานประจำวัน เนื่องจากให้ผลลบที่ indirect antiglobulin test แต่จะให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธี adsorption-elution เท่านั้น เนื่องจากบน

ผิวเม็ดโลหิตแดงมีการแสดงออกของแอนติเจน D น้อยมาก คนที่มีการแสดงออกของแอนติเจน D บนผิวเม็ดโลหิตแดงเป็นแบบ Del พบว่าแอนติเจน D บนผิวเม็ดโลหิตแดงมี epitopes เหมือนคนทั่วไปที่มีหมู่โลหิต RhD บวก แต่มีการแสดงออกของแอนติเจน D เพียง 20-30 ตำแหน่ง เมื่อเทียบกับแอนติเจน D ปกติที่มีเป็นแสนตำแหน่ง¹⁸ นอกจากนี้มีการศึกษาของต่างประเทศ พบว่าแอนติเจน D ที่ตรวจด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีเป็น RhD ลบ เมื่อนำยีนของ RhD ลบเหล่านั้นมาตรวจด้วยวิธีทางโมเลกุลพบว่า เป็น partial D ชนิด Del ถึงร้อยละ 10-30^{18,20-23} นอกจากนี้ RhDel ส่วนใหญ่² ไม่สร้าง anti-D เมื่อได้รับโลหิตที่เป็น RhD บวก ดังนั้นจึงสามารถรับโลหิต RhD บวกได้อย่างปลอดภัย และมีรายงานผู้ป่วยหมู่โลหิต RhD ลบ เมื่อได้รับโลหิตที่มีพีโนทัยป์แบบ Del สามารถสร้าง anti-D ขึ้นมาได้³⁻⁶ ดังนั้นการหาความถี่และลักษณะระดับโมเลกุลของยีน RhDel ในผู้ที่ตรวจด้วยเทคนิคทางซีโรโลยีเป็น RhD ลบ จะทำให้ทราบความถี่ของ RhDel ในคนไทย ซึ่งจะ เป็นประโยชน์ในการวางแผนทางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจแอนติเจน D ในผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วยเพื่อการพิจารณาให้โลหิตแก่ผู้ป่วยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Fongsarun J, Nuchprayoon I, Yod-in S, Kupatawintu P, Kidprasirt C. Blood Groups in Thai Blood Donors. *Thai J Hematol Transfus Med* 2002;12(4):277-86.
- Shao CP. Transfusion of RhD-positive blood in "Asia type" DEL recipients. *New Engl J Med* 2010; 362:472-3.
- Flegel WA GC, Gassner W, Ruff H, Wagner FF. RHD genotyping of blood donors may avoid anti-D immunization. *Blood* 2004;104:739.
- Flegel WA. Homing in on D antigen immunogenicity. *Transfusion* 2005;45:466-8.
- Wagner T, Kormoczi GF, Buchta C, Vadon M, Lanzer G, Mayr WR, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:520-6.
- Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion* 2005;45:1581-4.
- Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol* 2001;8:163-99.
- Cherif-Zahar B, Mattei MG, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron JP, Colin Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. *Hum Genet* 1991;86:398-400.
- Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab* 2002;48:53-9.
- Hyland CA, Wolter LC, Saul A. Identification and analysis of Rh genes: application of PCR and RFLP typing tests. *Transfus Med Rev* 1995;9:289-301.
- Srijinda S, Suwanasophon C, Visawapoka U, et al. RhC Phenotyping, Adsorption/Elution Test, and SSP-PCR: The Combined Test for D-Elute Phenotype Screening in Thai RhD-Negative Blood Donors. *ISRN Hematol* 2012;358316.
- Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC genet* 2001;2:10.
- Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion* 2005;45:527-38.
- Singleton BK, Green CA, Kimura K, Minami A, Okubo Y, Daniels GL. Two new RHD mutations associated with the Del phenotype [Abstract]. *Transfus Clin Biol* 2001;8:9s.
- Chang JG, Wang JC, Yang TY, et al. Human RhDel is caused by a deletion of 1,013 bp between introns 8 and 9 including exon 9 of RHD gene. *Blood* 1998;92:2602-4.
- Richard M, Perreault J, Constanzo-Yanez J, Khalife S, St-Louis M. A new DEL variant caused by exon 8 deletion. *Transfusion* 2007;47:852-7.
- Luettringhaus TA, Cho D, Ryang DW, Flegel WA. An easy RHD genotyping strategy for D- East Asian persons applied to Korean blood donors. *Transfusion* 2006;46:2128-37.
- Shao CP, Maas JH, Su YQ, Kohler M, Legler TJ. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang* 2002;83:156-61.
- Kormoczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 2005;45:1561-7.
- Mak KH, Yan KF, Cheng SS, Yuen MY. Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens. *Transfusion* 1993;33:348-51.
- Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T, Nagao N. A D variant, Del?. *Transfusion* 1984;24:542.
- Sun CF, Chou CS, Lai NC, Wang WT. RHD gene polymorphisms among RhD-negative Chinese in Taiwan. *Vox Sang* 1998;75:52-7.
- Li Q, Ye LY, Guo ZH, Qian M, Zhu ZY. Study on the molecular background of Del phenotype in Chinese population. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi* 2006;23:486-91.