

บทความพิเศษ

Mutation in Rh Blood Group System

กัลยา เกิดแก้วงาม

ฝ่ายผลิตภัณฑ์ยาแอนติซีรัมและผลิตภัณฑ์เซลล์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย

หมู่เลือดในระบบ Rh มีความสำคัญรองจากระบบ ABO เพราะสามารถทำให้เกิดภาวะตัวเหลือง ของทารกในครรภ์และแรกคลอด (hemolytic disease of fetus and newborn) บันทึกเก่าที่สุดที่รายงานเรื่องนี้ไว้คือในคริสต์ศตวรรษที่ 1600 พบหญิงคลอดทารกแฝดสอง ทารกคนหนึ่งเกิด fatal hydrop อีกคนหนึ่งเสียชีวิตเพราะภาวะตัวเหลือง ในปี ค.ศ. 1939 Levine และคณะ รายงานว่ามีทารกคลอดออกมาตายเพราะครรภ์เป็นพิษ (erythroblastosis fetalis) เนื่องจากแม่ได้รับการถ่ายเลือดจากพ่อและมีปฏิกิริยาต่อต้านกับแอนติเจนจากพ่อ น้ำเหลืองจากแม่เด็กทำปฏิกิริยา agglutination กับเม็ดเลือดแดงของพ่อเด็กและกับเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตร้อยละ 80 ที่มีหมู่เลือด ABO เหมือนเธอ ปี ค.ศ. 1940 Landsteiner และ Wiener ทดลองฉีดเลือดของลิง Rhesus เข้าไปในกระต่าย กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่เกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงของผู้บริจาคโลหิตร้อยละ 80 จึงเรียกแอนติบอดีนี้ว่า rabbit anti-Rh โดยเข้าใจว่าเป็นแอนติบอดีชนิดเดียวกันกับ anti-Rh ในมนุษย์ ปี ค.ศ. 1942 Fisk และ Foord ได้ทำการทดลองเพื่อแสดงให้เห็นว่า rabbit anti-Rh เป็นแอนติบอดีชนิดเดียวกับ anti-Rh ในมนุษย์ โดยนำเม็ดเลือดแดงของทารกแรกเกิดมาตรวจชนิดแอนติเจนด้วย anti-Rh จากมนุษย์ หลังจากทราบผลว่าเป็น Rh positive หรือ Rh negative แล้วนำไปตรวจแอนติเจนอีกครั้งด้วย anti-Rh จากกระต่าย ปรากฏว่าได้ผล positive ทั้งหมด ไม่ว่าเม็ดเลือดแดงนั้นจะให้ผลเป็น Rh positive หรือ Rh negative กับแอนติบอดีของมนุษย์ ปี ค.ศ. 1963 Levine และคณะ พิสูจน์ว่า anti-Rh จากกระต่ายเป็นชนิดเดียวกับ anti-Rh จากมนุษย์ แต่ยังคงเก็บคำว่า “Rh” ไว้ใช้กับหมู่เลือดระบบนี้ ส่วน anti-Rh จากกระต่ายเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น anti-LW เพื่อเป็นเกียรติแก่ Landsteiner และ Wiener¹⁻³ แอนติเจนในระบบ Rh มีความเป็นแอนติเจนสูงมาก สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของ ผู้รับสร้างแอนติบอดีได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอนติเจน D มีความเป็นแอนติเจนสูงมากเป็นรองเฉพาะแอนติเจน A และแอนติเจน B ในระบบ ABO เท่านั้น ระบบ Rh มีหมู่เลือดที่แตกต่างกันคือ Rh positive และ Rh negative ขึ้นอยู่กับว่าบนผิวเม็ดเลือดแดงมี D แอนติเจนหรือไม่⁴ นอกจาก D แล้วแอนติเจนที่มีความสำคัญคือ C, E, c, e, C^w, C^x และอื่นๆ แอนติเจนในระบบ Rh

มีประมาณ 200,000 โมเลกุลต่อเซลล์⁵ ทำงานร่วมกับ RHAG (Rh associated glycoprotein) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง (membrane associated polypeptides) ระบบ Rh เป็นระบบที่ใหญ่ เกิด mutation ได้หลายแบบ เช่น gene deletion, point mutation และ gene insertion เป็นต้น มีความหลากหลายของยีนมาก^{2,4,6-8} ในระบบ Rh มีแอนติเจนเป็นจำนวนมากทำให้เกิด phenotype ที่แตกต่างกัน⁹ ทุกวันนี้ความเข้าใจพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (molecular genetics) มีมากขึ้นเพราะความก้าวหน้าของเทคโนโลยี DNA ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 เป็นต้นมา มีงานวิจัยเกี่ยวกับ mutation ของระบบ Rh โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Rh DEL ดีพิมพ์เผยแพร่เป็นจำนวนมาก ทั้งในยุโรป¹⁰⁻¹⁴ จีน¹³⁻¹⁵ เกาหลี^{16,17} และญี่ปุ่นซึ่งเป็นผู้ค้นพบ phenotype Rh DEL^{18,19}

Rh_{Null} Phenotype

Null Phenotype คือการเกิด mutation ของยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจนหมู่เลือดระบบใดระบบหนึ่ง ทำให้ไม่มีแอนติเจนของหมู่เลือดระบบนั้นบนผิวเม็ดเลือดแดงและบนเนื้อเยื่ออื่นๆ เพราะ mutation ทำให้ยีนไม่ทำงาน พบในหมู่เลือดหลายระบบ ในคนที่ phenotype Rh_{null} ไม่มีแอนติเจนในระบบ Rh เนื่องจากยีน RHAG (Rh-associated glycoprotein) เกิด mutation ยีน RHAG อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ตำแหน่ง 6p11-p21.1 ดังแสดงในรูปที่ 1 RHAG ไม่ได้เป็นยีนที่สร้างแอนติเจนหมู่เลือด แต่สร้าง glycoprotein ที่มีปลายข้างหนึ่งเป็น N-glycan chain ทำงานร่วมกับแอนติเจน D, C, E เป็นโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง การที่ยีน RHAG mutation ไม่สร้าง RhAG ทำให้แอนติเจน RhD และ RhCE แสดงออกไม่ได้ ทำให้เกิด Rh_{null} phenotype ไม่มีแอนติเจนในระบบ Rh บนผิวเม็ดเลือดแดง ส่งผลโดยตรงต่อรูปร่างและความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดแดงจะมีรูปร่างและการทำงานที่ผิดปกติ (stomatocytosis) รวมทั้งจะมีภาวะซีดร่วมด้วย^{1,2,5,7}

Rh Negative และ Rh DEL Phenotype

แอนติเจน D negative พบมากที่สุด ในคนผิวขาวชาวยุโรปร้อยละ 15-17 ของประชากร ในคนผิวดำแอฟริกันพื้นเมืองร้อยละ

3-5 ของประชากร แต่หาได้ยากในคนไทย พบน้อยกว่าร้อยละ 0.1 ของประชากร นักประชากรศาสตร์พยายามที่จะใช้การกระจายตัวของแอนติเจน D negative ทำนายต้นกำเนิดมนุษย์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อสรุปว่าทำไมแอนติเจน D negative จึงพบมากในคนผิวขาวชาวยุโรป แอนติเจน D negative เกิดจากการ mutation ของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน Rh คือยีน *RHD* อยู่บนแขนสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 1 ตำแหน่ง 1p34.1-1p36 ดังแสดงในรูปที่ 1 และรูปที่ 2 โดยอยู่ชิดติดกันกับยีน *RHCE* ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน C และ E มีความยาวประมาณ 450,000 base pairs ทั้งสองยีนมี 10 exons และเป็น homologous กัน ยีน *RHD* มีหน้าที่สร้างแอนติเจน D ยีน *RHCE* มีหน้าที่สร้างแอนติเจน Cc และแอนติเจน Ee^{1,7,9,10,20} แอนติเจน D negative ส่วนใหญ่เกิดจาก deletion mutation มีการขาดของยีน *RHD* ทั้งยีน โดยขาดตั้งแต่ Exon 1 ถึงปลาย 3' ท้ายสุดของ Exon 10 ทำให้สร้างแอนติเจน D ไม่ได้ เมื่อทำ DNA typing จะไม่พบยีน *RHD* ใน genomes ของคนที่เป็น Rh negative แท้^{1,2,20} ส่วนในคนที่ Rh DEL phenotype นั้นเกิดจากการ mutation ของยีน *RHD* หลายแบบแตกต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ และยังคงมียีน *RHD* ใน genomes ของคนที่เป็น Rh DEL phenotype¹⁹ ยีน *RHD* จะแสดงออกได้ไม่เต็มที่ แอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดง

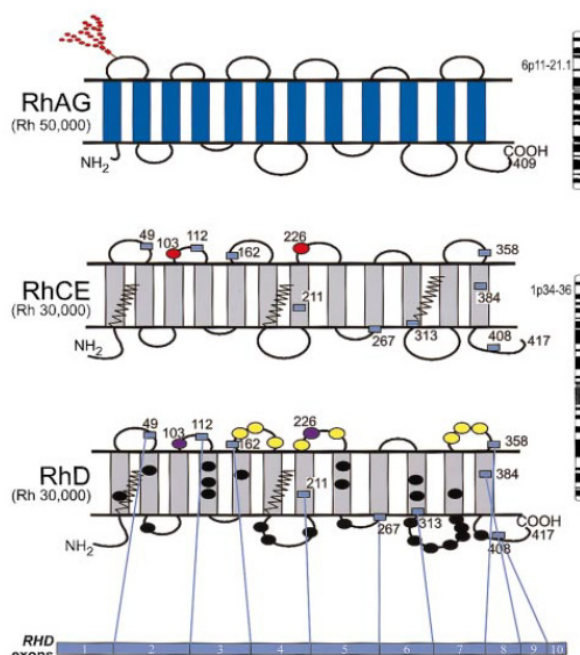


Figure 1 Model of topology for RhAG, RhCE and RhD. RhAG (M_r 50000) consist of 409 amino acids and is encoded by *RHAG* on chromosome 6p11-p21.1. RhCE and RhD (M_r 30000) are predicted to have a similar topology and are encoded by *RHCE* and *RHD*, which adjacent on chromosome 1p34-p36.¹⁰

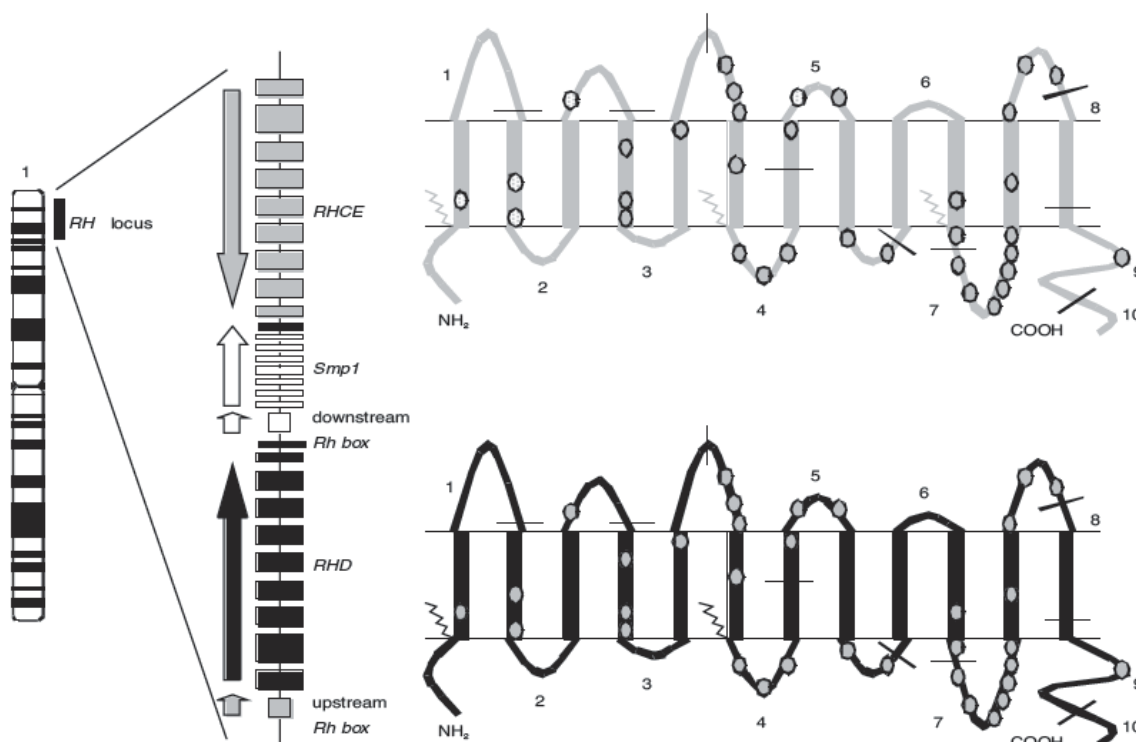


Figure 2 Schematic representation of chromosomal arrangement of the RH locus, the *RHD* and *RHCE* genes and the RhD and RhCE polypeptides⁷

จึงมีความแรงอ่อนมาก

การระบุว่าเป็นหมู่เลือด Rh negative ในปัจจุบันใช้วิธี antihumanglobulin test ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันเป็นส่วนใหญ่ในเอเชียและแอฟริกา ซึ่งมีข้อด้อยคือไม่สามารถตรวจหมู่เลือดในกลุ่ม Rh DEL ได้ เพราะกลุ่ม Rh DEL มีความแรงของแอนติเจน D อ่อนมาก คำว่า DEL ย่อมาจาก D elution¹⁸ เพราะตรวจพบได้ด้วยวิธี absorption-elution test ด้วย polyclonal anti-D²¹ Monoclonal anti-D²² จากบริษัทต่างๆ หรือวิธี DNA typing เท่านั้น^{1,7,20,23} phenotype Rh DEL พบครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นโดย Okubo Y. และคณะ ในปี ค.ศ. 1984 สังเกตว่า D negative บางคนทดสอบแล้วว่าไม่ใช่ weak D สามารถจับกับ anti-D ได้โดยทราบจากการทำ absorption-elution จึงเรียกเม็ดเลือดแดงพวกนี้เป็นการชั่วคราวว่า D_{el} แล้วทำการศึกษา D negative ที่ตรวจด้วยวิธี antihumanglobulin test จำนวน 2,896 ราย พบว่าเป็น Rh DEL 298 ราย คิดเป็นร้อยละ 10.3 หลังจากนั้นจึงส่งตัวอย่างไปให้ Gamma Biologicals, Houston, TX. ตรวจก็ได้ผลตรงกัน¹⁸ คำเรียกที่ใช้เรียก phenotype นี้ในงานวิจัยต่างๆ มีหลายแบบ ได้แก่ RhD_{el}, RhD^{el}, D_{el}, D^{el}, Dels และ DEL ปัจจุบันใช้คำว่า DEL กลุ่ม Rh DEL ถูกจัดอยู่ในพวก Rh positive ชนิด weak D^{7,24} ในกรณีเป็นผู้บริจาคโลหิตเพราะสามารถตรวจพบแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงและสามารถกระตุ้นให้คนไข้ Rh negative แท้ สร้าง anti-D ขึ้นมาได้ มีหลายรายงานที่ระบุว่าการให้เลือด DEL กระตุ้นการสร้าง anti-D ในผู้ป่วย Rh negative แท้ รายงานแรกในออสเตรเลียพบ ผู้ป่วยหญิงอายุ 58 ปี Rh negative (D-C- E- c+e+) ไม่เคยรับเลือดมาก่อน ไม่เคยปลูกถ่ายอวัยวะ มีประวัติตั้งครรภ์ 1 ครั้งเมื่อ 36 ปีก่อน ลูกเป็น Rh negative (D-C-E-c+e+) เช่นเดียวกับแม่ ได้รับเลือดจากผู้บริจาคโลหิตชาวออสเตรเลียซึ่งตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน indirect antiglobulin test เป็น Rh negative (D-C+E-c+e+) ผล crossmatch เข้ากันได้ หลังรับเลือดผู้ป่วยสร้าง anti-D ความแรงคือ titer 1:128 แต่ไม่เกิด hemolytic transfusion reaction ระดับ hemoglobin ไม่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากผู้ป่วยสร้าง anti-D โดยไม่ทราบสาเหตุ ดังนั้นจึงตรวจสอบขั้นตอนการให้เลือดทั้งหมดแต่ก็ไม่พบความผิดปกติ นำเลือดของผู้บริจาคโลหิตไปทำ DNA typing ด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยใช้ sequence-specific priming (PCR-SSP) พบว่ายีน *RHD* mutation เกิด gene deletion 4 nucleotides ตำแหน่ง *RHD* intron 5 (*RHD* IVS5-38del4) และการทดสอบด้วยเทคนิค adsorption-elution แสดงว่าผู้บริจาคโลหิตเป็น Rh DEL²²

รายงานที่ 2 ในญี่ปุ่นผู้ป่วยหญิงอายุ 67 ปี Rh negative

(D-C- E- c+e+) มีประวัติการสร้าง anti-D มาก่อนจากการรับเลือด D positive เมื่อ 40 ปีที่แล้ว เข้ารักษาตัวในโรงพยาบาลครั้งหลังตรวจไม่พบ anti-D ได้รับเลือด D negative จากผู้บริจาคโลหิต 19 ราย หลังจากรับเลือดทั้งหมด ผู้ป่วยสร้าง anti-D ความแรงคือ titer 1:8 ไม่เกิดทั้ง acute หรือ delayed hemolytic transfusion reaction ระดับของ hemoglobin เพิ่มขึ้น ระดับ indirect bilirubin และ lactate dehydrogenase ไม่เปลี่ยนแปลง ต่อมา อีกสองปีผู้ป่วยได้เลือด D negative จากผู้บริจาคโลหิตอีก 40 รายที่ผลการตรวจ crossmatch เข้ากันได้ พบว่า anti-D ในผู้ป่วยมีความแรงเพิ่มขึ้นเป็น titer 1:128 ไม่เกิดทั้ง acute หรือ delayed hemolytic transfusion reaction ระดับของ hemoglobin, indirect bilirubin และ lactate dehydrogenase ไม่เปลี่ยนแปลง จึงนำเลือดจากผู้บริจาคโลหิตทั้ง 59 รายไปทำ DNA typing ด้วยวิธี Multiplex PCR-SSP พบว่ามี 2 รายเป็น Rh DEL genotype *RHD*(K409K)¹⁹

รายงานที่ 3 ในเกาหลีผู้ป่วยชายอายุ 68 ปี Rh negative (D-C- E- c+e+) ไม่เคยได้รับการถ่ายเลือดมาก่อน ไม่เคยปลูกถ่ายอวัยวะ ผ่าตัด bypass หลอดเลือดหัวใจ การตรวจกรองแอนติบอดีก่อนผ่าตัดได้ผลลบได้รับเลือด D negative 2 units ที่ผล crossmatch เข้ากันได้ระหว่างผ่าตัด หลังผ่าตัด 5 วัน ระดับ hemoglobin ต่ำมากจึงได้รับ D negative ที่ผล crossmatch เข้ากันได้เพิ่มอีก 2 units อีกประมาณ 9 วันต่อมา การตรวจกรองแอนติบอดีของคนไข้ได้ผลบวก ตรวจแยกชนิดแอนติบอดีได้ anti-D ไม่พบว่าเกิดทั้ง acute หรือ delayed hemolytic transfusion reaction ระดับของ hemoglobin, indirect bilirubin และ lactate dehydrogenase ไม่เปลี่ยนแปลง เพราะผู้ป่วยสร้าง anti-D โดยไม่ทราบสาเหตุขั้นตอนของการตรวจก่อนให้เลือดถูกตรวจสอบโดยละเอียด อย่างไรก็ตามไม่พบความผิดปกติ จึงนำเลือดของผู้บริจาคทั้ง 4 รายไปตรวจ *RHD* gene โดยวิธี real-time PCR พบว่ามีผู้บริจาคโลหิต 1 ราย เป็น Rh DEL *RHD*(K409K)¹⁶ มีผู้สงสัยว่าในกรณีที่ผู้ป่วยเป็น Rh DEL จะสามารถให้เลือด Rh positive ได้หรือไม่ Chao-Peng Shao ศึกษาในชาวจีน พบว่า Rh DEL ส่วนใหญ่จะไม่สร้าง anti-D ดังนั้น คนที่เป็น DEL จึงสามารถรับเลือด Rh Positive ได้โดยไม่มีความเสี่ยง²⁴ อย่างไรก็ตามมีผู้คัดค้านเพราะเคยมีรายงานว่า D variants สามารถสร้าง anti-D ต่อขึ้นส่วนของ D แอนติเจนที่ตัวเองสร้างไม่ได้¹¹

การศึกษา mutation ของยีน *RHD* ในคนแอฟริกันพบว่าเกิด mutation ของยีน *RHD* แบบ gene insertion มี nucleotide 37 base pairs เข้าแทรกใน exon 4 ทำให้ intron 3 และ exon

4 มีความยาวเพิ่มขึ้น กลายเป็น *RHD* pseudogene (*RHD*ψ) ผลคือเกิด reading frame shift และ stop codon ที่ตำแหน่ง 210 ใน exon ที่ 6 ทำให้ไม่สามารถ translation เป็นแอนติเจน D ได้ ร้อยละ 14 ของคนแอฟริกันผิวดำ Rh negative เกิดจาก mutation แบบดังกล่าว^{1,8,9,12} phenotype *RHD*ψ ในคนแอฟริกันผิวดำควรจะถูกจัดอยู่ในพวก Rh negative แต่ เพราะถึงจะมี *RHD* ใน genome ก็ไม่พบว่าสร้าง mRNA ที่จะ translation เป็นแอนติเจน D อีกทั้งคนที่มี phenotype *RHD*ψ สามารถสร้าง anti-D ได้⁸ mutation อีกแบบหนึ่งที่พบในคนแอฟริกันผิวดำ คือ ยีนลูกผสม *RHD/CE* hybrids (*RHD-CE-D*^s) เกิดจากยีน *RHCE* ขาดแล้วแทรกเข้าไปในยีน *RHD* ที่อยู่ใกล้กัน ที่ปลาย 3' ของ exon ที่ 3 ไปถึง exon ที่ 4 ถึง 8 เกิดเป็น (*C*)*ce*^s haplotype การ mutation แบบนี้ทำให้เกิดความผิดปกติทั้งแอนติเจน D, C, E โดยจะไม่สามารถสร้างแอนติเจน D แต่สามารถสร้างแอนติเจน C ได้เล็กน้อย phenotype ที่ปรากฏคือ D-C^{weak} c+E-e+VS+V- ยีนลูกผสมนี้จะมี Leu245Val substitution สามารถสร้างแอนติเจน VS ได้ แอนติเจน VS มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเกิด phenotype weak C ร้อยละ 3 ของคนแอฟริกันผิวดำ Rh negative เกิดจาก mutation แบบนี้^{8,9}

ในคนเอเชียผิวเหลืองพบประชากรที่เป็น Rh negative น้อยกว่าร้อยละ 0.1 ทำให้การศึกษา Rh DEL phenotype ยังอยู่ในวงจำกัด ประเทศที่ทำงานวิจัยเรื่องนี้แล้วคือ ญี่ปุ่น ไต้หวัน เกาหลี และจีน ประมาณกันว่า D negative ที่ตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน antihumanglobulin test ในชาวเอเชียจะเป็น Rh DEL ถึงร้อยละ 12.8 ในชาวจีน Rh DEL ที่พบส่วนใหญ่คือ alleles *RHD*(K407K) หรือ alleles *RHD*(1227G>A)^{9,13} หรือเรียกว่า “Asia Type”¹² ในไต้หวันพบ alleles *RHD*(delEX9) มากที่สุด⁹ ในญี่ปุ่นพบ alleles *RHD*(G314V) ร้อยละ 13.8 ของ Rh negative ทั้งหมด⁹ ในคนผิวขาวพบการ mutation ของยีน *RHD* หลายแบบที่แตกต่างจาก

คนแอฟริกันผิวดำและคนเอเชียผิวเหลือง⁹ mutation ในคนผิวขาวชาวยุโรปจะเกิดจากการขาดของยีน *RHD* ทั้งยีน mutation แบบนี้ทำให้เกิด phenotype Rh negative แต่ จะไม่พบยีน *RHD* ใน genome ของคนที่มี phenotype เช่นนี้ Rh DEL phenotype ในคนผิวขาวมีหลายแบบ มีทั้งแบบที่เหมือนกับคนผิวดำและเหมือนกับคนผิวเหลือง แบบที่เหมือนในคนผิวดำคือยีนลูกผสม *RHD/CE* hybrids (*RHD-CE-D*^s) แบบที่เหมือนกับคนผิวเหลืองคือ alleles *RHD* (K409K)²⁵ นอกจากนั้นยังพบ mutation ของยีน *RHD* ในคนผิวขาวอีกหลายแบบ เช่น nonsense mutations ทำให้เกิด allele *RHD*(Q41X), deletion mutation ทำให้เกิด allele *RHD*(488del4), missense mutation ทำให้เกิด allele *RHD* 885T, splice-site mutation ทำให้เกิด allele *RHD* IVS3+1A และ hybrid gene mutation ทำให้เกิด alleles *RHD-CE*(2-9)-D และ *RHD-CE*(4-7)-D^{9,20,25} Wagner และคณะ อธิบายว่า Rh DEL น่าจะมีอย่างน้อย 3 alleles ที่เกิดจาก mutation แบบ single missense (point mutation), splicing-site และ gene deletion คือ *RHD*(M295I, 885G>T), *RHD*(K409K, 1277G>A) และ *RHD*(IVS5-38del4)^{11,19,22} Rh negative ส่วนใหญ่เกิดจาก unequal crossing over ดังแสดงในรูปที่ 3⁷

Partial D และ weak D Phenotype

ดังที่ได้กล่าวไว้ในตอนต้นแล้วว่า หมู่เลือดในระบบ Rh มีความหลากหลายมาก เนื่องมาจากยีน *RHD* และ *RHCE* อยู่ชิดกันมากจึงทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของยีน (gene tandem arrangement) ได้บ่อย เกิดเป็น variant alleles ใหม่ๆ ได้มากมาย การ mutation ของยีน *RHD* บางอย่าง ทำให้ไม่สามารถสร้างแอนติเจน D ที่สมบูรณ์ได้ โดยอาจจะสร้างแอนติเจน D ได้ไม่ครบทุก epitope มีบาง epitope ที่ขาดหายไป⁷ คนที่เป็น Partial D นั้นเกิดจาก mutation ของยีน *RHD* และ hybrid ของยีน *RHCE* ทำให้มี

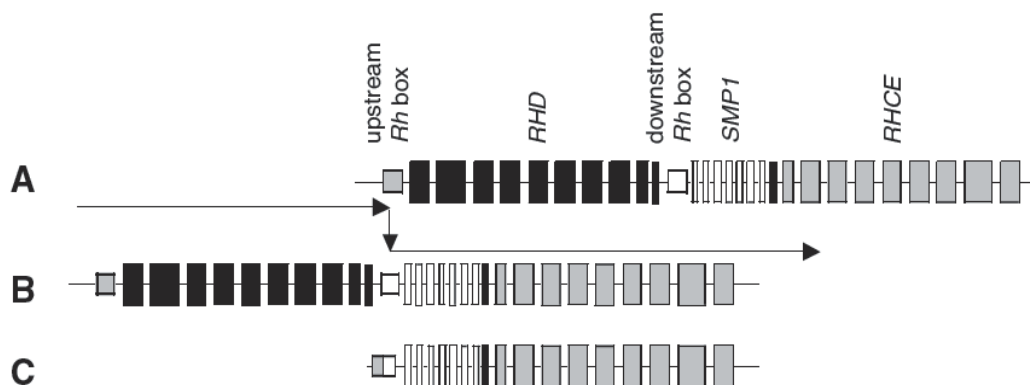


Figure 3 The Structure of the RH locus (A) and the proposed mechanism of unequal crossing over (B) causing a RHD negative RH locus (C).⁷

ลักษณะของแอนติเจน D ที่ผิดปกติ คือสามารถสร้าง anti-D ต่อ epitope ของแอนติเจน D ที่ตัวเองไม่มีได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วย แอนติเจน D โมเลกุลที่สมบูรณ์ รวมทั้งไม่เกิดปฏิกิริยา agglutination กับ monoclonal anti-D บางชนิด ทุกวันนี้มีการจัดจำแนก partial D ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามการเกิด mutation ได้แก่ แบบที่หนึ่ง mutation แบบ hybrid ของยีน *RHD/CE* เกิดขึ้นเพราะ ยีน *RHD* และ *RHCE* เหมือนกันมาก เกิด gene conversion มีการขาดของยีนแล้วต่อกันใหม่แบบสลับ เกิด alleles ใหม่ที่เป็น ลูกผสมของยีนทั้งสองมากกว่า 20 ชนิด ตัวอย่างเช่น *RHD-CE-D* หรือ *RHCE-D-CE* เป็นต้น phenotype ของ partial D ที่พบส่วนใหญ่คือ D^{III} , D^{FR} , D^{V} , $D^{\text{IVb-like}}$, D^{VI} , DBT และ R_0^{Har} โดยแต่ละ phenotype มีความแรงของแอนติเจนที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงไม่ค่อยเกิดปฏิกิริยากับ monoclonal anti-D บางครั้งยากในการตรวจด้วยวิธีทาง serology แบบที่สอง missense mutation มีการศึกษาแล้วพบว่า phenotype ของ partial D มากกว่า 10 แบบ เกิดจาก single missense mutation (point mutation) ทำให้โปรตีน D ที่อยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์มีความผิดปกติ เป็นผลให้แอนติเจน D ผิดปกติไปด้วย แบบที่สาม Dispersed amino acid substitution เกิดจาก amino acid หลายตัวในแอนติเจน D หายไปแล้วถูกแทนที่ด้วย amino acid ตัวอื่นเป็นผลให้แอนติเจน

D ผิดปกติ ตัวอย่างเช่น D category IIIa, D category III type IV, D category Iva และ DAR partial D ชนิดนี้จะไม่พบในคนยุโรปแต่จะพบบ่อยมากในคนแอฟริกา ทำให้มีปัญหามากในแอฟริกา เพราะยากที่จะตรวจด้วยวิธี serology ที่ใช้ monoclonal anti-D²⁶

ตามปกติแล้วคนที่ไม่มีแอนติเจน D ที่สมบูรณ์ หรือคนที่ เป็น Rh positive ปกติ จะมีความหนาแน่นของแอนติเจน D บนผิวเม็ดเลือดแดงอยู่ระหว่าง 15,000 โมเลกุล (R_1r) ถึง 33,000 โมเลกุล (R_2R_2) ต่อเซลล์ อย่างไรก็ตามคนที่ เป็น Rh positive ชนิด weak D นั้น จะพบว่า มีแอนติเจน D เพียง 70 โมเลกุลถึง 5,200 โมเลกุล ต่อเซลล์เท่านั้น ในคนผิวขาวพบ phenotype weak D ร้อยละ 0.2 ถึงร้อยละ 1 ในคนผิวเหลือง weak D ที่มีความแรงอ่อนมาก ก็คือ Rh DEL phenotype นั้นเอง⁷ งานวิจัยมากมายแสดงให้เห็นว่า คนที่มี phenotype weak D นั้นเกิด missense mutation ที่ยีน *RHD* ทำให้โปรตีน D ที่อยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์มีความผิดปกติ ส่งผลให้แอนติเจน D มีความผิดปกติด้วย ซึ่งแตกต่างจาก missense mutation ที่เกิดใน partial D เพราะ partial D เกิดจากความผิดปกติของโปรตีน D ที่อยู่ด้านนอกเยื่อหุ้มเซลล์ ในยุโรป weak D ที่พบส่วนใหญ่เป็น type 1 และ type 2 ในปี 2002 พบว่ามี weak D มากกว่า 20 ชนิด²⁶ partial D และ weak D ชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 4

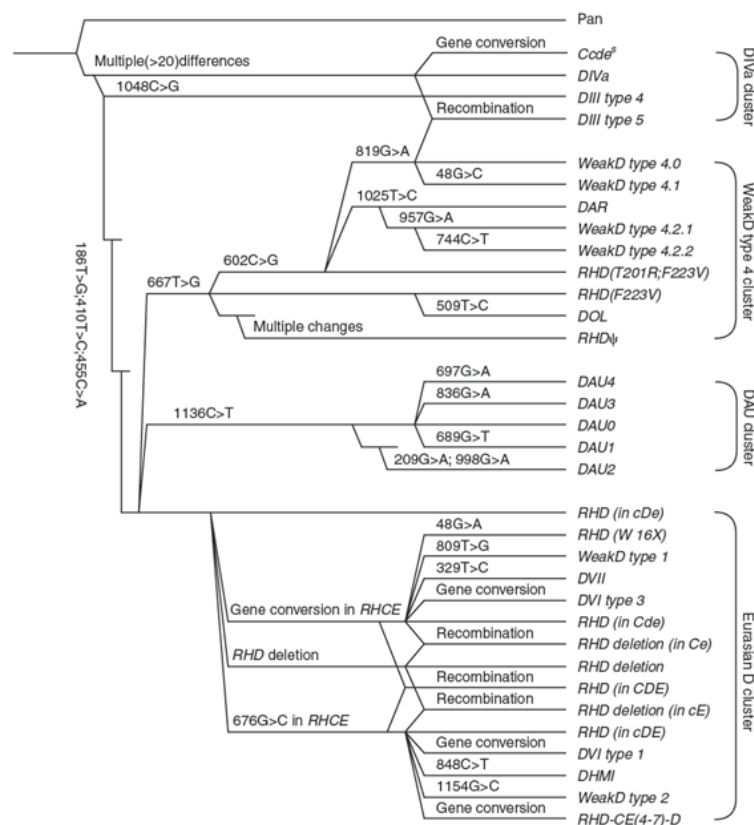


Figure 4 Phylogeny of RHD in humans⁷

เนื่องจากปัจจุบันนี้ประเทศไทยใช้วิธีมาตรฐาน antihuman-globulin test เป็นวิธีที่ใช้แยก Rh positive กับ Rh negative ทำให้ไม่สามารถแยก Rh DEL ออกมาจากกลุ่ม Rh negative ได้ อีกทั้ง Rh DEL ก็สามารถกระตุ้นให้ Rh negative แท้ สร้าง anti-D ขึ้นมาได้ ทำให้เป็นปัญหาเกี่ยวกับการให้เลือด ในประเทศของเรา ยังไม่มีการศึกษาวิจัย Rh DEL มากพอ ดังนั้นควรสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ Rh DEL ในคนไทยให้มากขึ้นยิ่งขึ้น

References

- Westhoff CM. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion* 2004; 44:1663-73.
- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-8.
- Scott ML. The complexities of the Rh system. *Vox Sang* 2004;87(Suppl 1):S58-62.
- Hyland CA, Wolter LC, Saul A. Three Unrelated Rh D Gene Polymorphisms Identified among Blood Donors with Rhesus CCee (r'r') Phenotypes. *Blood* 1994;84:321-4.
- Nicolas V, Kim CLV, Gane P, et al. Rh-RhAG/Ankyrin-R, a New Interaction Site between the Membrane Bilayer and the Red Cell Skeleton, Is Impaired by Rh_{null}-associated Mutation. *The Journal of Biological Chemistry* 2003;278:25526-33.
- Le Van Kim C, Mouro I, Che'rif-Zahar B, et al. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:10925-9.
- Rhenen DJV, Löwenberg B, Steegers EAP, et al. Rh Variability in Multi-Ethnic Perspective Consequences for RH Genotyping. Proefschrift Martine Tax 2006. Doctoral Thesis. The Netherland Organization for Health, Research and Development. *Sanquin Blood Bank South West region*; 2006.
- Rodrigues A, Rios M, Pellegrino Jr J, et al. Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-D^s gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research* 2002;35:767-73.
- Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-8.
- Christiansen M, Sørensen BS, Grønner N. RHD positive among C/E+ and D- blood donors in Denmark. *Transfusion* 2010;50:1460-4.
- Körmöczy GF, Gassner C, Shao CP, et al. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 2005;45:1561-7.
- 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.
- Xu Q, Grootkerk-Tax MG, Maaskant-van Wijk PA, van der Schoot CE. Systemic analysis and zygosity determination of the RHD gene in a D-negative Chinese Han population reveals a novel D-negative RHD gene. *Vox Sang* 2005;88:35-40.
- Shao CP, Maas JH, Su YQ, et al. Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D_{el} and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang* 2002;83:156-61.
- Shao CP, Wang BY, Ye SH, et al. DEL RBC transfusion should be avoided in particular blood recipients in East Asia due to allosensitization and ineffectiveness. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* In press. 2012.
- Kim KH, Kim KE, Woo KS, et al. Primary anti-D Immunization by DEL Red Blood Cells. *Korean Journal Laboratory Medicine* 2009;29:361-5.
- Kim JY, Kim SY, Kim CA, et al. Molecular characterization of D- Korean persons: development of a diagnostic strategy. *Transfusion* 2005;45:345-52.
- Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T, et al. A D variant, D_{el}? *Transfusion* 1984;24:542.
- Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, et al. Secondary anti-D immunization by D_{el} red blood cells. *Transfusion* 2005;45:1581-4.
- Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000;95:3662-8.
- Wang YH, Chen JC, Lin KT, et al. Detection of RhD_{el} in Rh D-negative person in clinical laboratory. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 2005;146:321-5.
- Wagner T, Körmöczy GF, Buchta C, et al. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005;45:520-6.
- Chang JG, Wang JC, Yang TY, et al. Human RhD^{el} Is Caused by a Deletion of 1,013 bp Between Intron 8 and 9 Including Exon 9 of RHD Gene. *Blood* 1998;92:2602-4.
- Shao CP. Transfusion of RhD-Positive Blood in "Asia Type" DEL Recipients. *N Engl J Med* 2010;362:472-3.
- Chen JC, Lin TM, Chen YL, Wang YH, Jin YT, Yue CT. RHD 1227A Is an Important Genetics Marker for RhD_{el} Individuals. *Am J Clin Patho* 2004;122:193-8.
- Flegel WA, Wagner FF. Molecular Biology of partial D and weak D: Implication for Blood Bank Practice. *Clin Lab*. 2002;48:53-59.
- Wagner FF, Frohman A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* 2001;2:1-11.