บทบรรณาธิการ

Miltenberger Subsystem

ศศิธร เพชรจันทร[1] และ อ้อยทิพย์ ณ ถลาง[2]

[1]ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล [2]บัณฑิตศึกษา คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Miltenberger subsystem (Mi subsystem) หรือ MNS blood group variants[1] หมายถึง กลุ่มแอนติเจนที่พบได้น้อย (low frequency antigens) ของหมู่เลือดระบบ MNS ซึ่งเป็นหมู่เลือดที่มีการค้นพบเป็นลำดับที่สองต่อจากหมู่เลือดระบบ ABO ในปี ค.ศ. 1927 Landsteiner และ Levine ได้ฉีดเม็ดเลือดแดงของคนเข้าไปในกระต่ายทำให้เกิดการสร้าง anti-M และ anti-N ต่อมาในปี ค.ศ. 1947 Walsh และ Montgomery ได้รายงานการค้นพบ anti-S และในปี ค.ศ. 1951 Levine และคณะ ได้รายงานการค้นพบ anti-s จากการค้นพบแอนติเจนเหล่านี้ Race และ Sanger ได้ให้ชื่อรวมว่าเป็นหมู่เลือดระบบ MNSs แต่ต่อมา ISBT Working Party on Terminology for Red Cell Surface Antigen ได้เปลี่ยนชื่อเป็น MNS Blood Group System ปัจจุบันมีรายงานการพบแอนติเจนของหมู่เลือดระบบนี้มากถึง 46 ชนิด แต่แอนติเจนที่สำคัญคือ M, N, S, s และ U ซึ่งมีความแตกต่างกันตามเชื้อชาติ อีกทั้งยังมีความสำคัญทางคลินิก เพราะมีรายงานว่าแอนติบอดีต่อแอนติเจนเหล่านี้ ทำให้เกิด hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) และ hemolytic transfusion reactions (HTR) ทั้งชนิด acute และ delayed type ได้

Miltenberger subsystem classification[2]

นอกจากแอนติเจนดังกล่าวแล้ว ในระบบ MNS ยังมีกลุ่มแอนติเจนที่พบได้น้อยและพบได้ในบางเชื้อชาติเท่านั้น ซึ่งรวมเรียกว่า low frequency antigens เริ่มจากในปี ค.ศ. 1946 Graydon ได้รายงานการพบแอนติเจน Gr (Graydon) ในปี ค.ศ. 1951 Levine และคณะ ได้รายงานการพบแอนติเจน Mi[a] (Miltenberger) และในปี ค.ศ. 1954 Hart และคณะ ได้รายงานการพบแอนติเจน Vw (Verweyst) ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 1959 ได้มีการศึกษาที่แสดงว่าแอนติเจนนี้เป็นส่วนหนึ่งของหมู่เลือดระบบ MNS รวมทั้งมีการสรุปว่าแอนติเจน Gr และ Vw เป็นแอนติเจนตัวเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบว่า เม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็น Vw (+) และ Mi (a+) บางรายทำปฏิกิริยากับ anti-Mur และ anti-Hil หรือบางรายทำปฏิกิริยากับ anti-Mur เท่านั้น ในปี ค.ศ. 1966 Cleghorn จึงได้จัดทำ Miltenberger subsystem classification โดยจัดแบ่งเป็น red cell class 4 classes และต่อมาเพิ่มอีก 1 class รวมเป็น 5 classes คือ Mi.I ถึง Mi.V ตามปฏิกิริยาของ red cell class ต่างๆ กับ specific antisera ซึ่งประกอบด้วย anti-Mi[a], anti-Vw, anti-Hut, anti-Mur และ anti-Hil ดังแสดงใน Table 1 ต่อมาเมื่อพบว่าปฏิกิริยาของ Mi.III และ Mi.IV กับ anti-Hut นั้น แท้จริงแล้วเป็นปฏิกิริยากับ inseparable anti-Hut + anti-Mur จึงได้เปลี่ยนชื่อ antisera นี้ว่าเป็น anti-MUT ส่วน anti-Hut นั้นจะให้ปฏิกิริยาเฉพาะกับ Mi.II ซึ่งเป็น Hut (+) เท่านั้น

ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1966 เป็นต้นมา ได้มีรายงานการพบแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับ Miltenberger subsystem อีกหลายชนิด ซึ่งในปี ค.ศ. 1992 Tippett และคณะ และในปี ค.ศ. 1993 Reid และ Tippett ได้สรุปว่า Miltenberger subsystem มีทั้งหมด 11 classes (Mi.I ถึง Mi.XI) และให้ใช้ชื่อ GP รวมทั้งชื่อย่อของ

Table 1 The first five Miltenberger classes

Red cell class	Reaction with anti-				
	Mi[a]	Vw	Hut	Mur	Hil
Mi.I	+	+	0	0	0
Mi.II	+	0	+	0	0
Mi.III	+	0	+	+	+
Mi.IV	+	0	+	+	0
Mi.V	0	0	0	0	+

+ = agglutination; 0 = no agglutination

แอนติเจนในการเรียกชื่อ ในการจัด class หรือ subsystem นี้แยกโดยใช้ปฏิกิริยากับ specific antisera ต่างๆ รวม 11 ชนิด ดังแสดงใน Table 2

ส่วนการที่กำหนดให้เรียกชื่อใหม่ของแต่ละ class เป็น glycophorin (GP) นั้น เนื่องจากเมื่อศึกษาถึงระดับโมเลกุลแล้วพบว่าแอนติเจนกลุ่มนี้อยู่บน glycophorin A (GPA), glycophorin B (GPB) หรือเป็น hybrid ของ GPA และ GPB ซึ่งเกิดจาก crossover หรือ DNA conversion ของ *GPY* gene Mi. ทั้ง 11 classes ให้ปฏิกิริยากับ anti-Mi^a แตกต่างกัน กลุ่มที่ให้ผลบวกกับ anti-Mi^a ประกอบด้วย Mi.I (GP.Vw), Mi.II (GP.Hut), Mi.III (GP.Mur), Mi.IV (GP.Hop), Mi.VI (GP.Bun) และ Mi.X (GP.HF) สำหรับ anti-Mi^a ซึ่งตรวจพบเป็นครั้งแรกในซีรัมของ Mrs. Miltenberger นั้น เป็น polyspecific antibody ซึ่งประกอบด้วยแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดต่างๆ ของ Mi subsystem เช่น anti-Vw + anti-Hut + anti-Mur หรือ anti-Hut + anti-Mur เป็นต้น การที่จะบอกว่า anti-Mi^a ที่ตรวจพบในผู้ป่วยหรือผู้บริจาคโลหิตประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดใดบ้างนั้น จะต้องทดสอบระหว่าง anti-Mi^a กับแอนติเจนชนิดต่างๆ ซึ่งล้วนแต่พบได้น้อยมากในประชากร การศึกษาด้วย serologic test จึงเป็นไปได้ยากและไม่สมบูรณ์ เนื่องจากขาดทั้ง known antigen และ specific antibody ปัจจุบันถือว่าไม่มี single anti-Mi^a รวมทั้งไม่มีแอนติเจน Mi^a ด้วย การศึกษา Mi subsystem หรือ MNS hybrids ซึ่งเป็น MNS blood group variants ด้วยวิธี molecular biology จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมและสามารถให้ผลที่เชื่อถือได้ในปัจจุบัน

การศึกษา Miltenberger subsystem ในคนไทย

ในประเทศไทยการศึกษาเรื่อง Miltenberger subsystem เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1967 โดยศาสตราจารย์เกียรติคุณ แพทย์หญิง ทัศน์ยานี จันทนยิ่งยง จากการศึกษาแอนติเจนที่สำคัญของหมู่เลือดระบบต่างๆ จำนวน 42 แอนติเจนในเลือดคนไทยหมู่ O จำนวน 337 ราย เพื่อนำมาเตรียม panel cells สำหรับทำ antibody identification แทนการสั่งซื้อจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพง ได้พบผู้ที่เป็น Mi (a+) 4 ราย (1.19%) ซึ่งสูงกว่าการตรวจพบในคนเชื้อชาติอื่น[3] และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มในคนไทย จำนวน 2,500 ราย ตรวจพบ Mi (a+) จำนวน 243 ราย (9.7%) ซึ่งนับว่าสูงที่สุดในโลกในขณะนั้น[4] การศึกษาในคนญี่ปุ่นโดย Mohn และคณะ ในปี ค.ศ. 1963 พบ Mi (a+) เพียง 1 ใน 3,350 ราย ส่วนในคนผิวขาวพบได้น้อยมาก สำหรับ Mi subsystem นั้น พบว่าในผู้ที่เป็น Mi (a+) จำนวน 243 รายนั้น ส่วนใหญ่เป็น Mi.III (GP.Mur) มีเพียง 1 รายที่เป็น Mi.I (GP.Vw) และอีก 1 ราย เป็น Mi.II (GP.Hut) การพบนี้แตกต่างจากการพบในคนผิวขาวที่มี Mi.I และ Mi.II มากกว่า Mi.III ต่อมาเมื่อนำ Mi (a+) red cells เป็น screen cells และ panel cells ทำให้ตรวจพบ anti-Mi^a อีกหลายรายทั้งในเลือดผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต

นอกจากการตรวจพบดังกล่าวแล้ว ยังได้มีการตรวจพบแอนติบอดีชนิดใหม่ในเลือดของผู้บริจาคโลหิตชาวไทยรายหนึ่ง ซึ่งเป็น Mi.III (GP.Mur) แต่ไม่เคยได้รับเลือดมาก่อน ได้ให้ชื่อว่า AY antibody หรือ Anek serum[5] แอนติบอดีชนิดนี้ทำปฏิกิริยากับ 7% ของผู้ที่เป็น Mi.III เท่านั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับผู้ที่เป็น Mi (a-), Mi.I, Mi.II และ Mi.V ในขณะเดียวกันได้มีการรายงานการพบ

Table 2 Terminology and antigens presented on Miltenberger subsystem

Terminology		Reaction of red cells with anti-									
Mi.	**GP.**	**Mi^a**	**Vw**	**Hut**	**Mur**	**MUT**	**Hil**	**TSEN**	**MINY**	**Hop**	**Nob**	**DANE**
Mi.I	GP.Vw	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mi.II	GP.Hut	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0
Mi.III	GP.Mur	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	0
Mi.IV	GP.Hop	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0
Mi.V	GP.Hil	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0
Mi.VI	GP.Bun	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0
Mi.VII	GP.Nob	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
Mi.VIII	GP.Joh	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0
Mi.IX	GP.Dane	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+
Mi.X	GP.HF	+	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0
Mi.XI	GP.JL	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0

anti-Raddon และ anti-Lane ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Mi subsystem เช่นเดียวกับ Anek serum จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิดนี้ ทำให้ได้ข้อสรุปว่า Anek serum คือ anti-Hop + anti-Nob เพราะให้ปฏิกิริยาทั้งกับ Mi.IV (GP.Hop) และ Mi.VII (GP.Nob) ส่วน anti-Raddon พบว่าเป็น anti-Nob + weak anti-Hop และ anti-Lane คือ anti-Nob[6]

การศึกษาคุณสมบัติของ anti-Mi^a เพื่อดูว่าประกอบด้วยแอนติบอดีชนิดใดบ้าง โดยทดสอบปฏิกิริยากับ Mi.I, Mi.II และ Mi.III ทำให้ตรวจพบ mixture ของแอนติบอดีได้หลากหลาย การทำ adsorption ด้วย Mi.class ชนิดต่างๆ พบว่า mixture ของแอนติบอดีบางรายไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่บางรายสามารถแยกออกจากกันเป็น specific antibody ได้ ดังรายงานในปี ค.ศ. 1975 ที่สามารถแยก anti-Vw, anti-Hut และ anti-Mur ออกจาก anti-Mi^a (anti-Vw + anti-Hut + anti-Mur) ของผู้ป่วยรายหนึ่งได้[7]

ความสำคัญทางคลินิกของแอนติบอดีต่อ Miltenberger subsystem

ด้านการจัดเตรียมเลือดให้ผู้ป่วย เนื่องจากคนไทยมี Mi (a+) สูงถึง 9.7% ทำให้สามารถตรวจพบ anti-Mi^a ทั้งในผู้ป่วยและผู้บริจาคโลหิต ซึ่งพบว่าเป็นแอนติบอดีชนิดที่พบได้มากในลำดับต้นๆ ของแอนติบอดีที่พบของคนไทย ถึงแม้ว่าแอนติบอดีกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็น IgM แต่มีรายงานทั้งในคนไทยและเชื้อชาติอื่นว่าพบเป็นชนิด IgG และทำให้เกิด HDFN[8] และ HTR[9] ได้ ดังนั้นในการให้เลือดผู้ป่วยจำเป็นต้องตรวจหา anti-Mi^a เสมอ ซึ่งถ้าตรวจพบก็จะต้องให้เลือดที่ไม่มีแอนติเจนชนิดเดียวกัน เพื่อป้องกันมิให้เกิด delayed HTR ได้ การเลือกใช้ screen cells และ panel cells สำหรับคนไทยและประชากรอาเซียนจึงมีความจำเป็นต้องมี Mi (a+) red cells ร่วมด้วยเสมอ โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ต้องได้รับเลือดเป็นประจำมีโอกาสถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีได้มาก

เนื่องจากแอนติบอดีของ Mi subsystem พบได้น้อยมากในคนเชื้อชาติอื่น แต่พบได้มากในคนไทยและประชากรอาเซียน ทำให้เกิดการขาดแคลน specific antisera อีกทั้งยังไม่มีจำหน่ายในท้องตลาดเหมือนแอนติบอดีชนิดอื่นๆ นอกจากการผลิต monoclonal antibodies การพบ specific antisera เหล่านี้ ในผู้บริจาคโลหิตหรือผู้ป่วย จึงเป็นแหล่งสำคัญของการมี local antisera ใช้ในปัจจุบัน แต่ยังมีปัญหาที่สำคัญคือมีไม่ครบทุกชนิดหรือมีจำนวนไม่มากพอ

ในด้านการศึกษาเกี่ยวกับ Mi subsystem เนื่องจากแอนติเจนของ Mi subsystem เป็น rare antigens และ polyspecific anti-Mi^a เป็น rare antibody ในประชากรเชื้อชาติอื่นๆ แต่พบได้ในคนไทย จึงเป็นจุดเริ่มต้นที่มีการขอหรือการแลกเปลี่ยนกับผู้ที่ศึกษาในเรื่องเดียวกัน นอกเหนือจากการจัดส่งเป็น rare cells และ rare antisera ในโครงการแลกเปลี่ยน Serum Cell And Rare Fluid (SCARF) ซึ่งแผนกธนาคารเลือด โรงพยาบาลศิริราช คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ร่วมเป็นสมาชิกแล้ว นับว่าเป็นการทำให้มีการศึกษาแอนติเจนและแอนติบอดีของ Mi subsystem ในเชื้อชาติต่างๆ อย่างกว้างขวาง ทำให้เกิดประโยชน์ในการจัดเตรียมเลือดที่ปลอดภัยมากขึ้นให้แก่ผู้ป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในภูมิภาคอาเซียนซึ่งมีการตรวจพบ Mi (a+) ได้มากเช่นเดียวกับคนไทย แต่เนื่องจากการตรวจทาง serology มีข้อจำกัด ขาดแคลนทั้งแอนติเจนและแอนติบอดีชนิดต่างๆ ดังได้กล่าวมาแล้ว ปัจจุบันการศึกษา Mi subsystem ที่เป็นประโยชน์และเหมาะสมกว่า จึงเป็นการศึกษาด้วยวิธี molecular biology

Molecular basis of variant phenotypes

นอกจากแอนติเจน M, N, S และ s ที่พบบนผิวเม็ดเลือดแดงแล้ว แอนติเจนของหมู่เลือดระบบMNS นี้ยังแบ่งได้อีกเป็นสองกลุ่ม คือ high prevalence antigens และ low prevalence antigens สำหรับกลุ่มที่เป็น low prevalence antigens นั้นเป็นแอนติเจนที่อยู่บน glycophorin A (GPA) หรือ glycophorin B (GPB) หรือ hybrids proteins ซึ่งมียีนที่ควบคุมการสร้างไกลโคโปรตีน (glycoprotein) คือ *GYP* (*GYP*A* และ *GYP*B*) กลไกทางพันธุศาสตร์ที่ทำให้เกิดความหลากหลายของการแสดงออกของแอนติเจนหมู่เลือดที่เป็น GP variant phenotypes เช่น single nucleotide substitution, unequal crossing over, gene conversion และ gene deletion ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส จากกลไกดังกล่าวส่งผลให้การแสดงออกของแอนติเจนบนเม็ดเลือดแดงเปลี่ยนไปได้หลายชนิด รายละเอียดดังแสดงใน Table 3[10,11]

Molecular basis ของ GP variants ในหมู่เลือดกลุ่ม the now obsolete Miltenberger subsystem แบ่งเป็นกลุ่มย่อยคือ

1. Glycophorin A-B hybrids:GP (A-B)

แอนติเจนของกลุ่มนี้คือ GP.Hil และ GP.JL ซึ่งเมื่อตรวจ phenotype โดยใช้เม็ดเลือดแดงกับ anti-Mi^a แล้วไม่เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่ม (Mi^a negative) การสร้าง GP ทั้งสองชนิดควบคุมโดย *GYP(A-B)* hybrid gene ซึ่ง *GYP*A* และ *GYP*B* junction ของยีน *GYP.Hil* อยู่ที่ปลาย 5' ของ intron 3 ของ *GYP*A* ขณะที่ *GYP*A* และ *GYP*B* junction ของ *GYP.JL* จะอยู่ที่ปลาย

Table 3 Hybrid alleles, encoded glycophorins (GPs), phenotypes, and associated low-prevalence antigens

Alleles	Glycophorin encoded	Phenotype	Associated low-prevalence antigen (s)
GYP(A-B)*	GP(A-B)	GP.Hil	Hil, MINY
		GP.JL	TSEN, MINY
		GP.TK	SAT
GYP(B-A)*	GP(B-A)	GP.Sch (M^r)	St^a
		GP.Dantu	Dantu
GYP(A-B-A)*	GP(A-B-A)	GP.M^g	Mg
		GP.KI	Hil
		GP.SAT	SAT
GYP(B-A-B)*	GP(B-A-B)	GP.Mur	Mi^a, Mur, MUT, Hil, MINY
		GP.Bun	Mi^a, Mur, MUT, Hop, Hil, MINY
		GP.HF	Mi^a, MUT, Hil, MINY
		GP.Hop	Mi^a, Mur, MUT, Hop, TSEN, MINY
	GP(A-B)	GP.He (P2, GL)	He
GYP(B-A-ψB-A)*	GP(A-A)	GP.Cal	He, St^a
GYP(A-ψB-A)*	GP(A-B-A)	GP.Vw	Mi^a, Vw
		GP.Hut	Mi^a, Hut, MUT
		GP.Nob	Nob
		GP.Joh	Nob, Hop
		GP.Dane	Mur, DANE
	GP(A-A)	GP.Zan (M^Z)	St^a
*GYP*A 179G>A*	GPA	GP.EBH	ERIK encoded by one transcript
	GP(A-A)	GP.EBH	St^a encoded by a second transcript
GYP(A-ψE-A)*	GP(A-A)	GP.Mar	St^a

ψ : pseudoexon

3' ของ intron 3 *GYP*A* และรวม 7 nucleotides (nts) ของ exon 4 ของ *GYP*B* เข้าไปด้วย GP.Hil phenotype พบร่วมกับ Ms หรือ Ns โดยทำให้การแสดงออกของแอนติเจน s เพิ่มขึ้น แต่การแสดงออกของแอนติเจน M และ N ลดลง อีกทั้งมีการแสดงออกของแอนติเจน Hil และ MINY ส่วนเม็ดโลหิตแดงของ GP.JL phenotype จะพบความเปลี่ยนแปลงของแอนติเจน S และการแสดงออกของแอนติเจน M, TSEN และ MINY ลดลง ความชุกของ GP.Hil ในผู้บริจาคโลหิตชาวสวิสนั้น พบได้ 1 รายใน 2,000 ราย และพบ 1 รายในชาวไต้หวัน แต่ไม่พบ GP.Hil เลยจากการตรวจคัดกรองในผู้บริจาคโลหิตชาวอังกฤษ 5,000 ราย สำหรับ GP.JL นั้น พบได้ในคนยุโรป คนจีนตอนใต้และ Hispanics[12,13]

2. Glycophorin A-B-A hybrids: GP(A-B-A)

แอนติเจนของกลุ่มนี้มี 5 ชนิด คือ GP.Vw, GP.Hut, GP.Nob, GP.Joh และ GP.Dane ควบคุมโดย *GYP(A-B-A)* hybrid genes ซึ่งมีการแทรกของส่วนสั้นๆ ประมาณ 1 ถึง 16 base pairs (bp) ของ pseudoexon ของ *GYP*B* แทนที่เข้าไปใน exon 3 ของ *GYP*A* ด้วยจำนวน nucleotides ที่เท่ากัน และกำหนดการแสดงออกของแอนติเจนกลุ่มนี้ สำหรับการแทนที่ของยีนที่ควบคุม GP.Vw และ GP.Hut ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 47 ทำให้ threonine บน GPA เปลี่ยนเป็น methionine และ lysine สำหรับ GP.Vw และ GP.Hut ตามลำดับ เมื่อตรวจ phenotype ของ GP.Vw และ GP.Hut โดยใช้เม็ดเลือดแดงกับ anti-Mi^a แล้วจะเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่ม (Mi^a positive) อีกทั้งเม็ดเลือดแดงของทั้งสอง phenotypes จะทำปฏิกิริยาจับกลุ่มกับ anti-Vw และ anti-Hut ตามลำดับ GP.Vw phenotype มักพบร่วมกับอัลลีล *Ns* หรือบางครั้ง *NS* แต่พบร่วมกับ *MS* ได้น้อย ขณะที่ GP.Hut พบร่วมกับแอนติเจน MS หรือ Ns ในสัดส่วนใกล้เคียงกัน สำหรับ GP.Vw phenotype พบได้ร้อยละ 1.43 ในคนสวิสทางตอนใต้ [14]

ส่วน GP.Nob, GP.Joh และ GP.Dane นั้น เมื่อทดสอบ phenotype โดยใช้เม็ดเลือดแดงกับ anti-Mi^a แล้วไม่เกิดปฏิกิริยาจับกลุ่ม (Mi^a negative) เม็ดโลหิตแดงของ GP.Nob phenotype ที่มีการแสดงออกของแอนติเจน Nob นั้นจากการวิเคราะห์โครงสร้าง GP.Nob พบความแตกต่างจาก GPA ของตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 68 ทำให้มีการเปลี่ยนจาก arginine เป็น threonine และตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 71 เปลี่ยนจาก tyrosine เป็น serine ซึ่งเกิดจาก nucleotides 10 ตัว (67-76) ใน exon 3 ของ *GYP*A* ถูกแทนที่ด้วย corresponding sequence ของ *GYP*B* pseudoexon สำหรับ GP.Nob phenotype นั้น มักพบร่วมกับ Ms หรือ MS ในผู้บริจาคโลหิตผิวขาวหมู่ O ที่ Bristol และ England จำนวน 4,929 ราย โดยพบได้ร้อยละ 0.06[15] ส่วน GP.Joh นั้นคล้ายกับ GP.Nob แต่มีการแสดงออกของทั้งแอนติเจน Nob และ Hop สำหรับความแตกต่างของ GPA ระหว่าง GP. Joh กับ GP.Nob คือ GP.Joh มีการเปลี่ยนแปลงเฉพาะตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 68 ทำให้มีการเปลี่ยนจาก arginine เป็น threonine เท่านั้น ความชุกของการตรวจพบ GP.Joh ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาที่ชัดเจน แต่มีรายงานครอบครัวที่มีอัลลีล *GYP* Joh* ซึ่งพบร่วมกับอัลลีล *Ns* ส่วน GP.Dane นั้นมีการแสดงออกของทั้งแอนติเจน Dane และ Mur ทำให้การตรวจแยก phenotype ของแอนติเจนทั้งสองชนิดนี้ด้วยวิธีซีโรโลยีทำได้ยาก ส่วน GP. Dane นั้น พบว่ามีความเปลี่ยนแปลงใน exon 3 ของ *GYP*A* ถูกแทนที่ด้วย corresponding sequence ของ *GYP*B* pseudoexon ทำให้เกิด gene conversion ของส่วน hepta peptide sequence คือเปลี่ยนเป็น *[54]Pro-Ala-His-Thr-Ala-Asn*[59] GP.Dane phenotype พบได้ร้อยละ 0.43 ใน Danes[16] ซึ่งพบร่วมกับอัลลีล *MS* แต่ในคนอเมริกันที่มีเชื้อสายอังกฤษโดยพบร่วมกับอัลลีล *Ms*[17]

3. Glycophorin B-A-B: GP(B-A-B)

แอนติเจนของกลุ่มนี้มี 4 ชนิดคือ GP.Mur, GP.Hop, GP.Bun และ GP.HF เมื่อตรวจ phenotype โดยใช้เม็ดเลือดแดงกับ anti-Mi^a แล้วเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่ม (Mi^a positive) การสร้าง GP ควบคุมโดย *GYP*(B-A-B)* hybrid genes ซึ่งอัลลีลในกลุ่มนี้มีการแสดงออกของ silent *GYP*B* pseudoexon 3 โดยที่อัลลีลของ *GYP*Bun* และ *GYP*Mur* มีความแตกต่างของ nucleotide ใน coding sequence เพียง 1 ตัวเท่านั้น ทำให้ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 57 เป็น arginine และ threonine สำหรับ GP.Mur และ GP.Bun ตามลำดับ ดังนั้น GP.Mur และ GP.Bun phenotypes จึงมีความเหมือนกันคือ เม็ดเลือดแดงเป็น Mur+, Hil+, MINY+ และ Mut+ แต่ GP.Bun จะมีการแสดงออกของแอนติเจน Hop ขณะที่ GP.Mur เป็น Hop- นอกจากนี้ GP.Mur และ GP.Bun จะมีการแสดงออกร่วมกับแอนติเจน s ซึ่ง GP.Bun พบร่วมกับ Ms ส่วน GP.Mur นั้นแสดงออกร่วมกับ Ms หรือ Ns โดยส่วนใหญ่เป็น Ns ในคนยุโรป สำหรับคนไทยและคนจีน GP.Mur ส่วนใหญ่แสดงออกร่วมกับ Ms[10,11] GP.Mur และ GP.Bun phenotypes พบได้น้อยใน Caucasians แต่ GP.Mur พบได้บ่อยในคนไทยร้อยละ 9.6[18] คนจีนพบได้ร้อยละ 5.0[19] คนจีนไต้หวันพบได้ร้อยละ 7.3[20] นอกจากนี้มีรายงานว่าคนที่มี GP.Mur จะมี resistant ต่อ *Plasmodium falciparum* เนื่องจากผิวของเม็ดเลือดแดงจะสามารถ up-regulate จำนวนของ band 3 ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงที่เป็น GP.Mur ทนต่อภาวะ osmotic stress ได้มากขึ้น[21] สำหรับ GP.Hop นั้น เหมือนกับ GP.Bun คือ Mur+, MUT+, Hop+ และ MINY+ แต่ GP.Hop เป็น TSEN+ และ Hil- สำหรับอัลลีลของ GP.Hop จะพบร่วมกับ S ขณะที่อัลลีลของ GP.Bun จะพบร่วมกับ s และมีรายงานคน Caucasians 2 รายที่เป็น GP.Hop ส่วน GP.HF นั้น จะจำแนกด้วยแอนติเจน M และมีแอนติเจน s ที่แรงกว่าปกติ อีกทั้งเม็ดเลือดแดงเกิดปฏิกิริยาจับกลุ่มกับ anti-Hil, anti-MINY และ anti-MUT GP.HF นี้เป็น GP hybrid ที่มีการแทรกของ 98 bp เข้าไปใน exon 3 ของ *GYP*A* ทำให้เกิดเป็น *GYP*(B-A-B)* hybrid ที่มี peptide ต่างจาก GP.Mur และ GP.BUN ด้วยกรดอะมิโน 5 ตัว และ 6 ตัวตามลำดับ[22,23]

Identification of glycophorin variants

เม็ดเลือดแดงที่มีการเปลี่ยนแปลงของ GPs นั้นสามารถตรวจแยกชนิดได้ด้วยวิธีทางซีโรโลยีและวิธีการตรวจระดับโมเลกุล แต่การตรวจทางซีโรโลยีต้องใช้แอนติซีรัมหลายชนิดที่มีความจำเพาะทำให้เป็นข้อจำกัดของห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดทั่วไปซึ่งอาจมีแต่เฉพาะ anti-Mi^a เท่านั้น ในการแยกชนิดของแต่ละ GP variants ต้องส่งมาตรวจยืนยันที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ หรือห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดของโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย สำหรับการตรวจระดับโมเลกุลของ GP variants ทำได้หลายวิธี เช่น Immuno blotting[24], PCR-restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP)[20] และ PCR-sequence specific primers (PCR-SSP)[25] จากรายงานการศึกษา GP variants ด้วยวิธี PCR-SSP โดยพูนทรัพย์ ผลาขจรสุข และคณะ ซึ่งได้ออกแบบ primers สองชุด ทำให้แยกกลุ่มตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจทางซีโรโลยีเป็น Mi^a positive ออกจาก Mi^a negative ได้ ซึ่งกลุ่ม Mi^a positive เหล่านั้น คือ GP hybrids ของ *GYP*(B-A-B)*: GP.Mur, GP.Hop, GP.Bun และ GP.HF รวมทั้ง *GYP*(A-B-A)*: GP.Vw และ GP.Hut ซึ่งผลการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR-SSP ให้ผลสอดคล้องกับการตรวจทางซีโรโลยีทุกราย[25]

โดยสรุปในประเทศไทยการตรวจคัดกรองผู้บริจาคโลหิตที่เป็น Mi^a negative สำหรับการเตรียมโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตให้กับผู้ป่วยที่ตรวจพบ anti-Mi^a นั้นส่วนใหญ่ยังคงใช้การตรวจด้วยวิธีซีโรโลยี แต่จากการศึกษาพบว่า หากใช้การตรวจคัดกรองผู้บริจาคโลหิตด้วยวิธีพีซีอาร์สามารถให้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ วิธีทำง่าย สะดวกและสามารถทำได้พร้อมกันจำนวนมาก เป็นการช่วยลดขั้นตอนการจัดหาโลหิตที่เหมาะสมและปลอดภัยแก่ผู้ป่วย

เอกสารอ้างอิง

1. *Issitt PD, Anstee DJ. Applied blood group serology. 4th ed. Durham : Montgomery Scientific Publications, 1998.*
2. *Cleghorn TE. A memorandom on the Miltenberger blood group. Vox Sanguinis 1966;11:219-22.*
3. *Chandanayingyong D, Sasaki TT, Greenwalt TJ. Blood groups of the Thais. Transfusion 1967;7:269-76.*
4. *Chandanayingyong D, Pejrachandra S. Studies on the Miltenberger complex frequency in Thailand and family studies. Vox Sang 1975;28;152-5.*
5. *Chandanayingyong D, Pejrachandra S, Poole J. Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger complex of antigens : I. Anek serum. Vox Sang 1977;32:273-3.*
6. *Giles CM, Chandanayingyong D, Webb AJ. Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger complex of antigens : III. Anek, Raddon and Lane antisera in relation to each other and the Miltenberger complex. Vox Sang 1977;32:277-9.*
7. *Chandanayingyong D, Bejrachandra S. Separable anti-Hut which is specific for class II of the Miltenberger complex. Vox Sang 1975;28:149-51.*
8. *Cheng G, Hui CH, Lam CK, Hal SY, Wong L, Mak KH, Lin CK. Haemolytic transfusion reactions due to Mi-antibodies: need to include Miltenberger III positive cells in pre-transfusion antibody screening in Hong Kong. Clin Lab Haematol 1995;17:183-4.*
9. *Chiewsilp O, Yodpornpin W, Cherdchai S. Delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-Mi^a [in Thai]. Thai J Hematol Transfu Med 1996;6:289-90.*
10. *Reid ME. MNS blood group system: A review. Immunohematology 2009;25:95-101.*
11. *Lomas-Francis C. Miltenberger phenotypes are glycophorin variants: a review. ISBT Science Series 2011;6:296-301.*
12. *Ratliff J, Veneman S, Ward J, Lomas-Francis C, Hue-Roye K, Velliquette RW, et al. An alloantibody to a high-prevalence MNS antigen in a person with a GP.JL/Mk phenotype. Immunohematology 2007;23:146-9.*
13. *Metaxas MN, Metaxas-Bøhler M, Heiken A, Vamosi M, Ikin EW, Bull W. Further examples of Miltenberger cell class V, one of them inerited with a depressed M antigen. Vox Sang 1972;23:420-8.*
14. *Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 6th eds. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1975.*
15. *Webb AJ, Giles CM. Three antibodies of the MNSs system and their association with the Miltenberger complex of antigens. II. Raddon and Lane sera. Vox Sang 1977;32:274-6.*
16. *Skov F, Green C, Daniels G, Khalid G, Tippett P. Miltenberger class IXof the MNS blood group system. Vox Sang 1991;61:130-6.*
17. *Velliquette RW, Palacajornsuk P, Hue-Roye K, Lindgren S, Ilstrup S, Green C, et al. Novel GYP(A-B-A) hybrid gene in a DANE+ person who made an antibody to a high-prevalence MNS antigen. Transfusion 2008;48:2618-23.*
18. *Chandanayingyong D, Pejrachandra S. Studies on the Miltenberger complex frequency in Thailand and family studies. Vox Sang 1975;28:152-5.*
19. *Poole J, King MJ, Mak KH, Liew YW, Leong S, Chua KM. The MiIII phenotype among Chinese donors in Hong Kong: immunochemical and serological studies. Transfus Med 1991;1:169-75.*
20. *Shih MC, Yang LH, Wang NM, Chang JG. Genomic typing of human red cell Miltenberger glycophorins in a Taiwanese population. Immunohematology 2000;40:54-61.*
21. *Hsu K, Chi N, Gucek M, Van Eyk JE, Cole RN, Lin M, Foster DB. Miltenberger blood group antigen type III (Mi.III) enhances the expression of band 3. Blood 2009;114:1919-28.*
22. *Storry JR, Poole J, Condon J, Reid ME. Identification of a novel hybrid glycophorin gene encoding GP.Hop. Transfusion 2000;40:560-5.*
23. *Huang CH, Kikuchi M, McCreary J, Blumenfeld OO. Gene conversion confined to a direct repeat of the acceptor splice site generates allelic diversity at human glycophorin (GYP) locus. J Biol Chem 1992;267:3336-42.*
24. *King MJ, Poole J, Anstee DJ. An application of immunoblotting in the classification of the Miltenberger series of blood group antigens. Transfusion 1989;29:106-12.*
25. *Palacajornsuk P, Nathalang O, Tantimavanich S, Bejrachandra S, Reid ME. Detection of MNS hybrid molecules in the Thai population using PCR-SSP technique. Transfus Med 2007;17:169-7.*