

## นิพนธ์ต้นฉบับ

## Molecular HLA-DR และ HLA-DQ Typing ในผู้ป่วย โรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

นิภาพรรณ ลีตระกูล\*

### บทคัดย่อ

**บทนำ:** การปลูกถ่ายไตเป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตใกล้เคียงกับคนปกติมากที่สุด แต่โอกาสที่จะได้รับไตบริจาคขึ้นอยู่กับชนิดของ human leukocyte antigen (HLA) ของผู้ป่วยว่าตรงกับชนิดของ HLA ผู้บริจาคมากหรือน้อยเพียงใด จึงได้ศึกษาหาความถี่ของ HLA-DRB1 และ HLA-DQB1 allele ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่รอรับการปลูกถ่ายไต

**วัสดุและวิธีการ:** นำเลือด acid citrate dextrose ครบส่วน จำนวน 10 มล. ของผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่เข้ารับการรักษาระหว่างเดือนเมษายน 2543 ถึง เดือนธันวาคม 2544 เพื่อขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไต จำนวน 65 ราย เป็นชาย 46 ราย หญิง 19 ราย มีอายุระหว่าง 18 ปี ถึง 62 ปี มาสกัด DNA โดยวิธี salting out และตรวจหา HLA-DRB1 และ HLA-DQB1 allele โดยวิธี DNA based typing (LiPA HLA, a reverse hybridization line probe assay)

**ผลการศึกษา:** พบ HLA-DRB1 จำนวน 24 alleles และ HLA-DQB1 จำนวน 12 alleles จำนวนความถี่ของ DRB1 และ DQB1 alleles ที่มีมากกว่าร้อยละ 10 คือ DRB1\*1501 (ร้อยละ 23.1), DRB1\*1401 (ร้อยละ 13.8), DRB1\*09012 (ร้อยละ 12.3), DRB1\*12021 (ร้อยละ 11.5), DQB1\*0502 (ร้อยละ 24.6), DQB1\*0301 (ร้อยละ 16.9), DQB1\*05011 (ร้อยละ 16.1) และ DQB1\*0303 (ร้อยละ 13.8) ความถี่ของ HLA-DRB1-DQB1 haplotype ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ที่พบมากกว่าร้อยละ 10 มี 3 haplotype คือ DRB1\*09012-DQB1\*0303 (ร้อยละ 12.3), DRB1\*1501-DQB1\*05011 (ร้อยละ 10.8) และ DRB1\*1401-DQB1\*0502 (ร้อยละ 10.0)

**สรุป:** ความถี่ของ HLA alleles ที่พบได้บ่อยช่วยในการทำนายโอกาสและคัดเลือกผู้บริจาคที่เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยที่ขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไต วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2545; 35: 3-13.

**คำรหัส:** HLA-DR, HLA-DQ, โรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย, HLA typing

\* งานธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

## **Abstract : Molecular HLA-DR and HLA-DQ Typing in End Stage Chronic Renal Failure Patient at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital**

**Leetrakool N.\***

**Introduction:** Kidney transplantation is the therapeutic strategy for end stage chronic renal failure patients for the better quality of life. The chance of the transplantation depend on the suitable human leukocyte antigen (HLA) match between the patient and donor. The aim of this study is to study the allele frequency of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 of chronic renal failure patient who are waiting for kidney transplantation.

**Materials and Methods:** Ten milliliters of acid citrate dextrose whole blood were collected from 65 unrelated chronic renal failure patients between April 2000 to December 2001. Forty-six of these patients were males and 19 were females with age range between 18 to 62 years. These patients are waiting for kidney transplantation at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital. The DNA was extracted from blood samples by salting out. HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allele were typed by DNA-based typing (LiPA HLA, a reverse hybridization line probe assay).

**Results:** In this study, 24 HLA-DRB1 and 12 DQB1 alleles were found. The DRB1 and DQB1 alleles showed the frequency more than 10% were DRB1\*1501 (23.1%), DRB1\*1401 (13.8%), DRB1\*09012 (12.3%), DRB1\*12021 (11.5%), DQB1\*0502 (24.6%), DQB1\*0301 (16.9%), DQB1\*05011 (16.1%) and DQB1\*0303 (13.8%). The frequency of HLA-DRB1-DQB1 haplotype which more than 10% were DRB1\*09012-DQB1\*0303 (12.3%), DRB1\*1501-DQB1\*05011 (10.8%) and DRB1\*1401-DQB1\*0502 (10.0%).

**Conclusion:** High frequency of the HLA alleles provides an important information for the better chance and selection of suitably matched donors of patients who are on waiting lists for kidney transplantation. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2002; 35: 3-13.

**Key words:** HLA-DR, HLA-DQ, chronic renal failure, HLA typing

---

\* Blood Bank section, Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

## บทนำ

Human Leukocyte Antigen (HLA) เป็น Major Histocompatibility Complex (MHC) ในคน ทำหน้าที่นำเสนอ peptide ของสิ่งแปลกปลอมให้กับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจาก HLA โมเลกุลมีลักษณะเป็น polymorphism คือมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล HLA จึงมีบทบาทสำคัญในการปลูกถ่ายอวัยวะและการปลูกถ่ายไขกระดูก<sup>1, 2</sup> นอกจากนี้ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคบางชนิด<sup>3</sup> ระบบ HLA เป็น genetic markers ที่ตั้งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6 เป็นระบบที่มีความสลับซับซ้อนมากที่สุด HLA แอนติเจนมีคุณสมบัติเป็น heterodimeric glycoprotein แบ่งออกเป็น HLA class I (HLA-A, -B, -C) และ HLA class II (HLA-DR, -DQ, -DP) โดย HLA โมเลกุลแต่ละชนิดจะมีจำนวนแอนติเจนแตกต่างกันและมีความถี่ที่ตรวจพบแตกต่างกันไปในแต่ละชนชาติ<sup>4</sup>

ลักษณะโครงสร้างของ HLA class I ประกอบด้วยสาย  $\alpha$ -chain ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  และ  $\alpha 3$ ) และ  $\beta 2$  microglobulin chain จากโครโมโซมคู่ที่ 15<sup>5</sup> ความแตกต่างของ amino acid ในส่วนของ  $\alpha 1$  และ  $\alpha 2$  ทำให้ HLA-A, -B, -C มีแอนติเจนที่ต่างชนิดกัน พบบนผิวเซลล์ที่มีนิวเคลียสทั่วร่างกาย ทำหน้าที่นำเสนอ peptide ของสิ่งแปลกปลอมให้แก่ CD8+ lymphocyte<sup>6</sup> ส่วน HLA class II ประกอบด้วยสาย  $\alpha$ -chain ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) และ  $\beta$ -chain ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ) ความแตกต่างของ amino acid ในส่วนของ  $\beta 1$  chain ทำให้ HLA-DR, -DQ และ DP มีแอนติเจนหลายชนิด พบบนผิวเซลล์ antigen presenting cells (APCs) ทุกชนิด HLA class II จะนำเสนอ peptide ของสิ่งแปลกปลอมให้แก่ CD4+ lymphocyte และเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะสลัดกราฟท์ (Graft rejection)<sup>7</sup> สำหรับ HLA-DR

นอกจาก gene ที่กำหนดการสร้าง DR  $\alpha$ -chain (DRA) และ DR  $\beta$ -chain (DRB1) แล้ว อาจมี gene DRB3, DRB4 หรือ DRB5 ปรากฏร่วมด้วยและแตกต่างกันไปตามชนิดของ DRB1<sup>8</sup>

ระบบ HLA เป็นระบบที่มีการถ่ายทอดจากบิดาและมารดาเป็นชุด ดังนั้นแต่ละบุคคลจึงมี HLA อยู่ 2 ชุด แต่ละชุดเรียกว่า haplotype ระบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของ HLA เป็นแบบ mendelian inheritance ดังนั้นโอกาสที่พี่น้องร่วมบิดามารดาเดียวกันจะมี HLA เหมือนกันทั้งสอง haplotype ร้อยละ 25 โอกาสที่จะเหมือนกัน 1 haplotype ร้อยละ 50 และโอกาสที่ไม่มี haplotype เหมือนกันเลย ร้อยละ 25<sup>9</sup>

เนื่องจากแต่ละ haplotype ประกอบด้วย gene ในตำแหน่ง (Locus) ต่างๆ คือ HLA-A, B, C, DR, DQ, DP ชนิดของ gene ในแต่ละตำแหน่งเรียกว่า allele ซึ่งปัจจุบันพบว่าไม่ต่ำกว่า 1,400 ชนิด<sup>10</sup> จะเห็นได้ว่า gene ในระบบ HLA มีความหลากหลายมากและแตกต่างกันไปในแต่ละชนชาติ แต่ละเผ่าพันธุ์ ดังนั้นโอกาสที่บุคคลซึ่งไม่ใช่พี่น้องกันจะมี HLA เหมือนกันทั้ง 2 haplotype นั้นเป็นเรื่องที่แทบจะเป็นไปไม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามในแต่ละชนชาติจะมี HLA ที่พบได้บ่อยๆ ทำให้มีโอกาสพบ HLA ที่เหมือนกันได้บ้างเป็นบางชนิด เช่น HLA-B42 พบมากในชาวแอฟริกา ในขณะที่ HLA-B46 พบมากในชาวเอเชีย<sup>11</sup> ดังนั้นการคัดเลือกผู้บริจาคอวัยวะจึงควรเลือกในคนที่มีเชื้อชาติเดียวกัน<sup>12</sup>

การปลูกถ่ายไตเป็นวิธีการรักษาผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตใกล้เคียงกับคนปกติมากที่สุด มีผู้ป่วยไตวายระยะสุดท้ายเป็นจำนวนมากที่รอรับการปลูกถ่ายไต แต่โอกาสที่จะได้รับไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตซึ่งเป็นพี่น้องที่มี HLA เหมือนกับผู้ป่วยอย่างน้อย

1 haplotype มีเพียงร้อยละ 25 จากพ่อ แม่หรือลูก ร้อยละ 50 ดังนั้นได้บริจาคจากผู้ป่วยสมองตายจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งและเป็นสิ่งที่มีค่ามากสำหรับผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย แต่โอกาสที่ผู้ป่วยเหล่านี้จะได้รับไตบริจาคขึ้นอยู่กับชนิดของ HLA ของผู้ป่วยว่าตรงกับชนิดของ HLA ผู้บริจาคมากหรือน้อยเพียงใด โดยพิจารณาความสำคัญของ HLA-DR, HLA-B และ HLA-A ตามลำดับ<sup>13</sup>

การศึกษานี้เป็นการศึกษาหาความถี่ของ HLA-DR และ HLA-DQ ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายในประชากรไทยภาคเหนือ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำนายโอกาสที่จะได้รับไตบริจาคจากผู้บริจาคที่เสียชีวิต

## วัสดุและวิธีการ

### ตัวอย่างผู้ป่วย

ผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนเมษายน 2543 ถึง เดือนธันวาคม 2544 เพื่อขึ้นทะเบียนรอรับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตและจากผู้บริจาคที่เสียชีวิตแล้ว แบ่งเป็นชาย 46 ราย หญิง 19 ราย มีอายุระหว่าง 18 ปี ถึง 62 ปี อายุเฉลี่ย 46 ปี ผู้ป่วยจำนวน 57 ราย มีเชื้อชาติไทย และเป็นคนไทยเชื้อสายจีน 8 ราย ผู้ป่วยจำนวน 58 รายมีภูมิลำเนาอยู่ในจังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทย (เชียงใหม่, เชียงราย, ลำพูน, ลำปาง, พะเยา, แพร่, น่าน และอุตรดิตถ์) และมีภูมิลำเนาอยู่ในภาคอื่นของประเทศไทยจำนวน 7 ราย

### ตัวอย่างเลือดและการเตรียม DNA

เลือดตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเป็นเลือด acid citrate dextrose ครบส่วนจำนวน 10 มล. นำเลือดมาปั่นแยกที่ความเร็ว 2,000 x g นาน 10 นาที ดูดส่วนบนที่เป็นพลาสมาทิ้งไป แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนที่

เป็นชั้นของ buffy coat ออกมาใส่ลงใน conical tube ขนาด 15 มล. ทำให้เม็ดเลือดแดงที่ปนมากับ buffy coat แตกโดยเติม Red cell lysis buffer (RCLB) ลงไป 10 มล. ผสมให้เข้ากันโดยการกลับลดไปมาหัวท้าย อย่างน้อย 2 นาที นำไปปั่นที่ 700 x g นาน 10 นาที ดูดส่วนบนทิ้งไป ทำซ้ำ 2-3 ครั้งครั้งสุดท้ายให้ดูดส่วนบนออกให้หมดจนเหลือแต่ white blood cell (WBC) pellets แล้วสกัด DNA ออกจาก WBC pellets โดยวิธี salting out<sup>14</sup> เตรียม DNA ให้มีความเข้มข้น 100 - 500 ng/ $\mu$ L

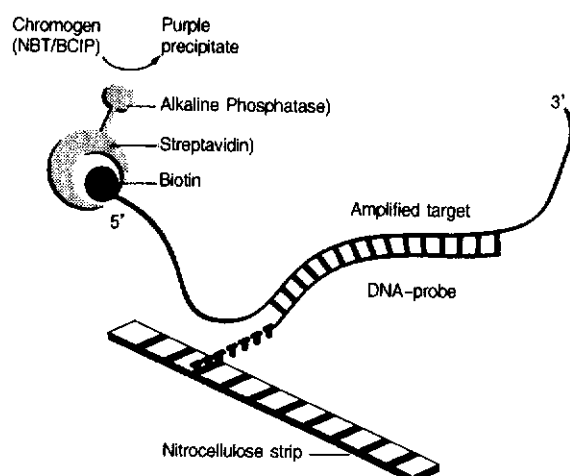
### การเพิ่มขยายปริมาณ DNA

ตัวอย่าง DNA นำไปเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วยเครื่องขยายปริมาณสารพันธุกรรม PE-2400 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT, USA) ในการทำวิธี PCR นั้นใช้น้ำยา LiPA HLA-DRB decoder Amplification (Murex Innogenetics, UK) ซึ่งมีส่วนผสมของ deoxynucleotide 5'-triphosphates (dNTPs), biotinylated primers,  $MgCl_2$  และ Taq DNA polymerase โดยใช้ primer solution (DRB1+3+4+5) สำหรับหา group specific และ sequence-specific ของ HLA-DRB alleles ในส่วนของ exon 2 และใช้น้ำยา INNO-LiPA HLA-DQB Amplification (Murex Innogenetics, UK), primer solution DQB1 สำหรับหา HLA-DQB1 alleles บน exon 2 โดยมีโปรแกรมการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ดังนี้ โปรแกรมที่ 1 denature 95 °C 5 นาที โปรแกรมที่ 2 denature 95 °C, 20 วินาที, anneal primers 58 °C, 20 วินาที, extend primers 72 °C, 20 วินาที ทำโปรแกรมที่ 2 ซ้ำจำนวน 35 รอบ ตามด้วยโปรแกรมที่ 3 elongate 72 °C 10 นาที ตรวจหา PCR product โดยใช้ 2% agarose gel (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) จะมีขนาดประมาณ

280 bp

### การตรวจ HLA-DR, DQ typing โดยวิธี reverse hybridization line probe assay (LiPA)

นำ PCR product มา hybridized กับ oligonucleotide probes ซึ่งเกาะติดอยู่บนแผ่น membrane (HLA-DRB จำนวน 62 probes, HLA-DQB จำนวน 21 probes) ที่อุณหภูมิ 56°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิชนิดเขย่าได้และมีฝาปิดมิดชิด (Julabo, SW 23: JULABO LABORTECHNIK GMBH, Germany) ต่อด้วยขั้นตอนทำให้เกิดสี ตรวจสอบจำนวนแถบสีที่เกิดขึ้น บันทึกผลและนำไปวิเคราะห์หา HLA-DR alleles และ HLA-DQ alleles ตามตารางการแปลผลหรือนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป LiPA-Expert หลักการของ LiPA HLA typing ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงหลักการของ LiPA HLA typing

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

นับจำนวน HLA-DR alleles และ HLA-DQ alleles แล้วนำไปคำนวณหาร้อยละของความถี่

โดยใช้สูตร Allele frequency = (ผลรวมของจำนวน allele / 2n) x 100; เมื่อ n คือจำนวนรายที่ใช้ในการศึกษา นับจำนวน HLA-DRB1-DQB1 haplotype และคำนวณหาความถี่ของ DRB1-DQB1 haplotype โดยใช้สูตร Haplotype frequency = (ผลรวมของจำนวน haplotype/2n x 100) เมื่อ n คือจำนวนรายที่ใช้ในการศึกษา<sup>15</sup>

### ผลการศึกษา

จากการศึกษา HLA-DR และ HLA-DQ ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย พบว่ามี HLA-DRB1 จำนวนทั้งสิ้น 24 alleles (ตารางที่ 1) มี HLA-DRB1 ที่มีความถี่มากกว่าร้อยละ 10 คือ DRB1\*1501 (ร้อยละ 23.1), DRB1\*12021 (ร้อยละ 11.5), DRB1\*1401 (ร้อยละ 13.9) และ DRB1\*09012 (ร้อยละ 12.3) โดยพบ DRB1\*1501 เป็นจำนวนมากที่สุด ส่วน HLA-DRB1 ที่มีความถี่น้อยกว่าร้อยละ 1 คือ DRB1\*0101, DRB1\*1502, DRB1\*15022, DRB1\*0432, DRB1\*1106, DRB1\*1108, DRB1\*1201, DRB1\*13, DRB1\*1404, DRB1\*0803 และ DRB1\*0812 ซึ่งพบเพียงร้อยละ 0.8 เท่านั้น

ผลการศึกษาพบว่า HLA-DQB1 ที่ตรวจพบมีจำนวนทั้งสิ้น 12 alleles (ตารางที่ 2) ชนิดของ HLA-DQB1 allele ที่พบได้บ่อยและมีมากกว่าร้อยละ 10 คือ DQB1\*0301 (ร้อยละ 16.9), DQB1\*0303 (ร้อยละ 13.9), DQB1\*05011 (ร้อยละ 16.2) และ DQB1\*0502 (ร้อยละ 24.6) ซึ่งเป็น DQB1 allele ที่พบมากที่สุด HLA-DQB1 allele ที่พบได้น้อยและมีความถี่น้อยกว่าร้อยละ 1 คือ DQB1\*0305 และ DQB1\*05032

HLA-DRB1-DQB1 haplotype ที่ตรวจพบมีจำนวน 39 haplotype ดังแสดงในตารางที่ 3 DRB1-DQB1 haplotype ที่พบได้บ่อยและมีมาก

กว่าหรือเท่ากับร้อยละ 10 คือ DRB1\*1501-DQB1\*05011 (ร้อยละ 10.8), DRB1\*1401-DQB1\*0502 (ร้อยละ 10.0) และ DRB1\*09012-DQB1\*0303 (ร้อยละ 12.3) ซึ่งเป็น

haplotype ที่พบบ่อยที่สุด และมี DRB1-DQB1 haplotype ที่พบน้อยกว่าร้อยละ 0.8 เป็นจำนวนทั้งสิ้น 23 haplotype

ตารางที่ 1 แสดงความถี่ของ HLA-DRB1 allele ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย จำนวน 65 ราย

| Generic groups | Alleles | จำนวน | ความถี่ (ร้อยละ) |
|----------------|---------|-------|------------------|
| DR1            | 0101    | 1     | 0.8              |
| DR2            | 1501    | 30    | 23.1             |
|                | 1502    | 1     | 0.8              |
|                | 15022   | 1     | 0.8              |
|                | 16021   | 10    | 7.7              |
| DR3            | 0301    | 4     | 3.1              |
|                | 0317    | 2     | 1.5              |
| DR4            | 0403    | 3     | 2.3              |
|                | 0405    | 3     | 2.3              |
|                | 0406    | 4     | 3.1              |
|                | 0432    | 1     | 0.8              |
| DR5            | 1101    | 8     | 6.1              |
|                | 1106    | 1     | 0.8              |
|                | 1108    | 1     | 0.8              |
|                | 1201    | 1     | 0.8              |
|                | 12021   | 15    | 11.5             |
| DR6            | 13      | 1     | 0.8              |
|                | 1401    | 18    | 13.8             |
|                | 1404    | 1     | 0.8              |
| DR7            | 0701    | 2     | 1.5              |
| DR8            | 0803    | 1     | 0.8              |
|                | 0812    | 1     | 0.8              |
| DR9            | 09012   | 16    | 12.3             |
| DR10           | 1001    | 4     | 3.1              |

ตารางที่ 2 แสดงความถี่ของ HLA-DQB1 allele ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย จำนวน 65 ราย

| Generic groups | Alleles | จำนวน | ความถี่ (ร้อยละ) |
|----------------|---------|-------|------------------|
| DQ2            | 0201    | 5     | 3.8              |
|                | 0203    | 3     | 2.3              |
| DQ3            | 0301    | 22    | 16.9             |
|                | 0302    | 8     | 6.1              |
|                | 0303    | 18    | 13.8             |
|                | 0305    | 1     | 0.8              |
| DQ4            | 0401    | 2     | 1.5              |
| DQ5            | 05011   | 21    | 16.1             |
|                | 0502    | 32    | 24.6             |
|                | 05031   | 8     | 6.1              |
|                | 05032   | 1     | 0.8              |
| DQ6            | 0601    | 9     | 6.9              |

ตารางที่ 3 แสดงความถี่ของ HLA-DRB1\*-DQB1\* haplotypes ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย จำนวน 65 ราย

| HLA | DRB1* | DQB1* | จำนวน | ความถี่ (ร้อยละ) |
|-----|-------|-------|-------|------------------|
| DR1 | 0101  | 05011 | 1     | 0.8              |
| DR2 | 1501  | 0203  | 1     | 0.8              |
|     | 1501  | 05011 | 14    | 10.8             |
|     | 1501  | 0502  | 6     | 4.6              |
|     | 1501  | 05031 | 2     | 1.5              |
|     | 1501  | 05032 | 1     | 0.8              |
|     | 1501  | 0601  | 6     | 4.6              |
|     | 1502  | 05011 | 1     | 0.8              |
| DR3 | 15022 | 0601  | 1     | 0.8              |
|     | 16021 | 0502  | 10    | 7.7              |
|     | 0301  | 0201  | 4     | 3.1              |
|     | 0317  | 0203  | 1     | 0.8              |
| DR4 | 0317  | 0502  | 1     | 0.8              |
|     | 0403  | 0302  | 2     | 1.5              |
|     | 0403  | 0305  | 1     | 0.8              |
|     | 0405  | 0302  | 1     | 0.8              |
|     | 0405  | 0401  | 2     | 1.5              |
|     | 0406  | 0302  | 4     | 3.1              |
|     | 0432  | 0302  | 1     | 0.8              |

ตารางที่ 3 (ต่อ)

|      |       |       |    |      |
|------|-------|-------|----|------|
| DR5  | 1101  | 0301  | 7  | 5.4  |
|      | 1101  | 0303  | 1  | 0.8  |
|      | 1106  | 0301  | 1  | 0.8  |
|      | 1108  | 0301  | 1  | 0.77 |
|      | 1201  | 0301  | 1  | 0.8  |
|      | 12021 | 0301  | 11 | 8.5  |
|      | 12021 | 0303  | 1  | 0.8  |
|      | 12021 | 0502  | 2  | 1.5  |
|      | 12021 | 05031 | 1  | 0.8  |
| DR13 | 13    | 0301  | 1  | 0.8  |
| DR14 | 1401  | 05011 | 1  | 0.8  |
|      | 1401  | 0502  | 13 | 10.0 |
|      | 1401  | 05031 | 4  | 3.1  |
|      | 1404  | 05031 | 1  | 0.8  |
| DR7  | 0701  | 0201  | 1  | 0.8  |
|      | 0701  | 0203  | 1  | 0.8  |
| DR8  | 0803  | 0601  | 1  | 0.8  |
|      | 0812  | 0601  | 1  | 0.8  |
| DR9  | 09012 | 0303  | 16 | 12.3 |
| DR10 | 1001  | 05011 | 4  | 3.1  |

### วิจารณ์

วิธีการตรวจหา HLA typing มีอยู่ 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ ระดับกลาง และระดับสูง วิธีการทำ แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ วิธีการทางซีโรโลยีโดยวิธี microlymphocytotoxicity ซึ่งจัดอยู่ในระดับต่ำ และวิธีการทางอณูชีววิทยาโดยการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction, PCR) เช่น PCR-SSP (sequence specific primer) และ PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide probe) ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 3 ระดับ ผลการตรวจโดยวิธีทางซีโรโลยีสามารถรายงานผลได้เพียง 2 ตำแหน่ง เช่น HLA-A24, HLA-DR15 ในบางครั้งไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น homozygous หรือ heterozygous

และอาจเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (Cross reaction) ในขณะผลการตรวจโดยวิธีการทางอณูชีววิทยา ให้ความละเอียดของผลการตรวจ HLA typing มากกว่าสามารถรายงานผลได้มากกว่า 2 ตำแหน่ง แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับของการตรวจ จำนวน primer และ จำนวน probe ที่นำมาใช้ เช่น HLA-DRB1\*1001, HLA-DQB1\*05011 ให้ความจำเพาะมากกว่าวิธีทางซีโรโลยี สามารถบอกรายละเอียดในระดับ homozygous และ heterozygous ได้<sup>6</sup> สำหรับวิธีการตรวจที่ใช้ในการศึกษา HLA-DRB1 และ HLA-DQB1 ในครั้งนี้สามารถให้ความละเอียดของผลการตรวจอยู่ในระดับต่ำถึงระดับกลางเท่านั้น ถ้าจะให้ผลการตรวจละเอียดมากขึ้นและให้ผลรวดเร็วมากกว่านี้ ต้องเพิ่ม

รายละเอียดของการตรวจหรือเปลี่ยนวิธีการตรวจเป็น PCR-SSP ในระดับสูง เพราะผลการตรวจ HLA typing ในระดับสูงมีความสำคัญมากในการปลูกถ่ายอวัยวะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกถ่ายไขกระดูกช่วยให้การคัดเลือกผู้บริจาคไขกระดูกเป็นไปอย่างถูกต้อง แม่นยำและตรงกันทุกประการกับผลการตรวจ HLA typing ของผู้ป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการได้รับไขกระดูกจากผู้บริจาคที่ไม่ใช่พี่น้องพ่อแม่เดียวกัน เพื่อป้องกันการเกิด graft versus host disease (GVHD)<sup>17</sup>

ในการปลูกถ่ายอวัยวะ (Solid organ transplantation) เช่น การผ่าตัดเปลี่ยนไตในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นใกล้เคียงกับคนปกติและสามารถมีชีวิตยืนยาวต่อไปได้อีก 10 ถึง 20 ปี ซึ่งนับว่าการผ่าตัดเปลี่ยนไตเป็นการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในปัจจุบัน ทั้งนี้เกิดจากปัจจัยหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาเทคนิคการผ่าตัด การตรวจคัดกรองผู้ป่วยและผู้บริจาคไต การพัฒนาประสิทธิภาพของยาที่ใช้ในการกดภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันการสลายตัวของไตใหม่ (Graft survival) ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าผู้ที่มีผล HLA-A, -B และ HLA-DR ไม่เหมือนกันตั้งแต่ 2 ถึง 6 alleles อย่างเห็นได้ชัด และเกิดการสลายตัวของไตใหม่เพิ่มขึ้นถ้ามีความแตกต่างของ HLA มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งความไม่เหมือนกันของ HLA class II ในตำแหน่ง DR locus จะยิ่งทำให้อัตราการเกิดการสลายตัวของไตใหม่มีมากกว่าผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนไตจากผู้ที่มี HLA-DR เหมือนกัน<sup>18</sup>

จากความแตกต่างของการพบและไม่พบ HLA alleles ในเปอร์เซ็นต์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อชาติหรือแม้แต่ภายในประเทศเดียวกันแต่ต่างภูมิภาคกัน ดังนั้นการปลูกถ่ายอวัยวะจึงสมควรคัดเลือกผู้บริจาคอวัยวะจากผู้ที่มีเชื้อชาติเดียวกัน เพื่อเพิ่มโอกาสในการหาผู้บริจาคอวัยวะที่มี HLA เหมือนหรือใกล้เคียงกับผู้ป่วยมากที่สุดเพื่อช่วยให้การผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะประสบผลสำเร็จสูงสุด การหาความถี่ในการตรวจ HLA-DRB1 และ HLA-DQB1 ในผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายที่รอรับการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่เสียชีวิตจากภาวะสมองตายจะช่วยทำนายโอกาสของผู้ป่วยในการที่จะได้รับไตบริจาค ถ้าผู้ป่วยมีผลการตรวจ HLA ที่ตรวจพบได้บ่อยในคนไทย จากการศึกษา HLA alleles ในคนไทยตามภาคต่างๆ จากหลายสถาบันในประเทศไทยพบว่า HLA alleles ในกลุ่ม HLA-DRB1\*15, -DRB1\*16 และ HLA-DRB1\*0901 พบได้บ่อยในคนไทยภาคเหนือเมื่อเทียบกับคนไทยในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะที่ HLA-DRB1\*0701 พบได้น้อยในคนไทยภาคเหนือแต่พบมากในคนไทยภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ<sup>19, 20</sup> ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ในปัจจุบันการปลูกถ่ายไตจากผู้บริจาคที่มีชีวิตและการจัดสรรอวัยวะจากผู้บริจาคที่มีภาวะสมองตาย อยู่ภายใต้การกำกับดูแลของศูนย์รับบริจาคอวัยวะสภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร ซึ่งเป็นองค์กรที่จัดสรรอวัยวะให้กับโรงพยาบาลสมาชิกทั่วประเทศที่มีความสามารถในการผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ ทั้งโรงพยาบาลของรัฐและเอกชน โดยความถูกต้องและยุติธรรม โดยพิจารณาจากความตรงกันของชนิด HLA ระหว่างผู้รับอวัยวะและผู้บริจาคอวัยวะจากผลการตรวจ HLA-DR, HLA-DQA1, HLA-DQB1 และ HLA-A เป็นสำคัญ HLA-B

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์นวลชิ้น คำทอง หัวหน้างานธนาคารเลือด อาจารย์ลัดดา พองสถิตย์กุล หัวหน้าหน่วยเก็บรักษาและบริการ ธนาคารเลือด โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนให้มีการวิเคราะห์และวิจัยในหน่วยงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธนาคารเลือดที่ปฏิบัติงานช่วยเหลือและดูแลผู้ป่วยเป็นอย่างดีและขอขอบคุณผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้ายทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการตอบข้อซักถามมา ณ ที่นี้ด้วย

### เอกสารอ้างอิง

1. Cecka JM. The role of HLA in renal transplantation. *Human Immunol* 1997; 56: 6-16.
2. Kaminski E, Sharrock C, Hows J, et al. Frequency analysis of cytotoxic T lymphocyte precursors possible relevance to HLA-matched unrelated donor marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3: 149-65.
3. Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997; 53: 1-11.
4. Bodmer JG, March SGE, Albert ED et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 1995; 46: 1-18.
5. Goodfellow PN, Jones EA, van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M, et al. The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HLA-A region. *Nature* 1975; 254: 267.
6. Brodsky FM, Lem L, Bresnahan PA. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 1996; 47: 464-71.
7. Liu Z, Colovai AI, Tugulua S, et al. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest* 1996; 98: 1150-7.
8. Trowsdale J. Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genetics* 1993; 9: 117-21.
9. Tyler V, editor. Technical Manual. 13<sup>th</sup> ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Bank; 1999: 357-74.
10. March SGE. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001; 57: 177-9.
11. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T. 11<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop. Data Analysis Book II, 1991 July 31; Yokohama, Japan: Fujitsu Limited; 1991. p.14.
12. Takemoto S, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM. Equitable allocation of HLA-compatible kidneys for local pools and for minorities. *N Eng J Med* 1994; 331: 760-4.
13. Zantvoort FA, D'Amaro J, Persijn GG, et al. The impact of HLA-A matching on long-term survival of renal allografts. *Transplantation* 1996; 61: 841-4.
14. Munkhbat B, Sato T, Hagihara M, Sato K, Kimura A, Munkhtuvshin N, Tsuji K. Molecular analysis of HLA polymorphism in Khoton-Mongolians. *Tissue Antigens*

- 1997; 50: 124-34.
15. Chandanayingyong D, Stephens HAF, Fan L, et al. HLA-DPB1 polymorphism in the Thais of Southeast Asia. *Hum Immunol* 1994; 40: 20-4.
  16. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-35.
  17. Drobyski WR, Klein J, Flomenberg N, et al. Superior survival associated with transplantation of matched unrelated versus one-antigen-mismatched unrelated or highly human leukocyte antigen-disparate haploidentical family donor marrow grafts for the treatment of hematologic malignancies: establishing a treatment algorithm for recipients of alternative donor grafts. *Blood* 2000; 99: 806-14.
  18. Kobayashi T, Yokoyama I, Uchida K, et al. The significance of HLA-DRB1 matching in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1992; 54: 238-41.
  19. Stephens HAF, Chandanayingyong D, Kunachiwa W, et al. A comparison of Molecular HLA-DR and DQ Allele Profiles Forming DR51-, DR52-, and DR53-related haplotypes in five ethnic Thai populations from mainland Southeast Asia. *Hum Immunol* 2000; 61: 1039-47.
  20. Sujirachato K, Chiewsilp P, Tsuji K, et al. HLA class II polymorphism in Thais detected by PCR-SSO and PCR-RFLP. *Tissue Antigens* 1994; 43: 224-8.