การศึกษา variant ของยีน CD36 ในผู้บริจาคโลหิตไทย ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

The study of CD36 gene variants in Thai blood donors from the National Blood Centre

มยุรี เก่งเกตุ และภาวิณี คุปตวินทุ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2558

ชื่อเรื่อง การศึกษา variant ของยีน CD36 ในผู้บริจาคโลหิตไทยของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
ผู้วิจัย มยุรี เก่งเกตุ และภาวิณี คุปตวินทุ
สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์ 2562
สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้างานวิจัย 75 หน้า **คำสำคัญ** CD36, Nak^a, Thai blood donors
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้ได้ทำการตรวจฟีโนไทป์ของ CD36 (Nak^a) และศึกษาชนิด variant ของยีน *CD36* ในผู้บริจาคเกล็ดโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความสำคัญทางคลินิก และพัฒนาชุดตรวจด้วยเทคนิคอื่น

วิธีการศึกษา ตรวจหา CD36 บนเกล็ดเลือดจำนวน 598 ตัวอย่าง และบนโมโนไซต์จำนวน 36 ตัวอย่าง ด้วยวิธี flow cytometry และศึกษา variant ของยีน CD36 โดยทำ DNA sequencing รายที่ให้ผล CD36 deficiency

ผลการศึกษา จากการศึกษาตรวจหาฟีโนไทป์ CD36 บนเกล็ดเลือดพบว่าเป็น CD36 positive (Nak^a positive) จำนวน 588 ตัวอย่าง (98.33%) และเป็น CD36 deficiency (Nak^a negative) จำนวน 10 ตัวอย่าง (1.67%) และผลการตรวจหา CD36 บนโมโนไซต์ของตัวอย่างที่ให้ผล CD36 deficiency จำนวน 6 ตัวอย่างพบให้ผล positive จำนวน 5 ตัวอย่าง เป็น CD36 deficiency type II (ขาด CD36 บนเกล็ดเลือดอย่างเดียว) และให้ผล negative จำนวน 1 ตัวอย่าง เป็น CD36 deficiency type I (ขาด CD36 ทั้งบนเกล็ดเลือดและบน monocyte) พบ variant ที่น่าสนใจได้แก่ 332-333 delCA ในตัวอย่าง CD36 deficiency type I และ 287 G>C และ c.-132A>C ในส่วน intron ใกล้ส่วน start codon จากการศึกษานี้บ่งบอกได้ว่าแอนติเจน CD36 (Nak^a) อาจก่อให้เกิดปัญหาทางคลินิกในคนไทยได้ เนื่องจากผู้ที่เป็น CD36 deficiency type I สามารถสร้างแอนติบอดีต่อ CD36 ได้ จึงควรจัดทำฐานข้อมูลผู้บริจาคที่เป็น CD36 deficiency เพื่อจัดหาเกล็ดเลือดให้ผู้ป่วยที่มีแอนติบอดีได้อย่างเหมาะสม

Research Title The study of CD36 gene variants in Thai blood donors from the National Blood Centre

Researcher(s) Mayuree Kengkate, Ph.D. and Pawinee Kupatawintu

Institution Huachiew Chalermprakiet University and National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Year of Publication 2019

Publisher Huachiew Chalermprakiet University

Sources Huachiew Chalermprakiet University

No. of Pages 75 **pages** **Keywords** CD36, Nak^a antigen, and Thai blood donors

Copyright Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

Objective: This research aimed to study CD36 (Nak^a) phenotype and type of variant of *CD36* gene in platelet apheresis donors from the National Blood Centre, Thai Red Cross Society in order to be used as a preliminary data in its clinical significance and to develop other methods for CD36 detection.

Methods: This research studied CD 36 phenotyping on 598 platelet samples and 36 monocyte samples obtained from platelet apheresis donors. All samples were phenotyped by flow cytometry and detected CD 36 variants by DNA sequencing method.

Results: CD36 positive (Nak^a positive) was found in 588 samples (98.33%) while CD36 deficiency (Nak^a negative) was found in 6 samples (1.67 %). CD36 deficiency was found in 6 monocyte samples; 5 samples were CD36 deficiency type II (lacking CD36 expression on PLTs only) while 1 sample was CD36 deficiency type I (lacking CD36 expression on PLTs and monocytes). This study found interesting variants which are 332-333 delCA in CD36 deficiency type I, and 287 G>C and c.-132A>C in intron which were near the start codon. This study found that Nak^a antigen may cause clinical problems in Thai population because CD36 deficiency type I person can produce antibodies against CD36 (Nak^a) antigen. Therefore, CD36 deficiency database should be established in order to provide suitable platelets for patient who have these antibodies.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.อิสยา จันทร์วิทยานุชิต พลตรีหญิง ศ.ดร.อ้อยทิพย์ ณ ถลาง ศ.ดร.พรรณี บุตรเทพ และ รศ.พญ.ศศิธร เพชรจันทร ที่ให้การสนับสนุน กำลังใจ และให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ในการทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงคอยชี้แนะในการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานวิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณ ผศ.สุชา จุลสำลี และอาจารย์ ดร.ธนสาร ศิริรัตน์ ในการช่วยเหลือด้านการเขียนวิจัย และวิเคราะห์ข้อมูลวิจัย ผศ.ดร.สุวรรณา เสมศรี รวมถึงบุคลากรคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และบุคลากรฝ่ายห้องปฏิบัติการพิเศษ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในการให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำการทำวิจัย และกำลังใจในการทำงาน

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ในการสนับสนุนในนโยบายงานวิจัย ทุนวิจัย และสถานที่ทำวิจัย และที่สำคัญขอบคุณครอบครัว และญาติมิตร ในการสนับสนุนเวลาและให้กำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ฆ
สารบัญตาราง		ง
สารบัญรูปภาพ		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
	ความความสำคัญและและที่มา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	ทบทวนวรรณกรรม	5
	กรอบแนวคิดการทำวิจัย	15
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย	16
	ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	16
	เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	18
	วิธีการตรวจหา CD36 ด้วยวิธี flow cytometry	20
	การตรวจวิเคราะห์หา variant ของยีน CD36	23
บทที่ 4	ผลการวิจัย	27
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัย	38
	อภิปรายผล	39
	ข้อเสนอแนะ	41
บรรณานุกรม		42
ภาคผนวก		
	ก ผลการตรวจ flow cytometry ทั้งหมด 598 ราย	47
	ข ผลงานตีพิมพ์	57
	ค เอกสารรับรองจริยธรรมงานวิจัย	74
	ง ประวัติย่อผู้วิจัย	75

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1	ข้อมูล Exon, Intron และ mutation ที่พบบนยีน CD36	10
2	ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับยีน CD36	24
3	ผลการตรวจ CD36 (Nak^a) phenotyping โดยวิธี flow cytometry	28
4	โปรแกรม PCR ที่เหมาะสมในแต่ละ exon	32
5	ผลการวิเคราะห์ DNA sequencing ของ Exon ที่ 2 – 14	33
6	ผลการตรวจ flowcytometry ทั้งหมด 598 ราย	47

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่

1	CD36 protein และ receptor sites	7
2	Flow chart การทำงานของ CD36	7
3	แสดงการอ่านผลปฏิกิริยา PCR	25
4	flow cytometry histogram ของเกล็ดเลือด CD36 negative และ CD36 positive	29
5	flow cytometry histogram ของโมโนไซต์ CD36 negative และ CD36 positive	29
6	แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 2-7	30
7	แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 6 – 7 และ Exon 9-11	31
8	แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 8 และ 12-14	31
9	ภาพ chromatogram ตำแหน่ง variant ของ exon 2-14	35

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มา

CD36 หรือ Nak^a เป็นไกลโคโปรตีนชนิดหนึ่งบนผิวเกล็ดเลือด หรือเรียกอีกชื่อว่า GPIV ในคนที่มี polymorphism บนยีน CD36 บางตำแหน่งอาจทำให้การสร้าง CD36 บนเกล็ดเลือดลดลง หรือหายไปเรียกว่า CD36 deficiency หรือ Nak^a negative ซึ่งคนที่เป็น Nak^a negative จะสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ Nak^a (anti- Nak^a) ได้ จากการกระตุ้นเมื่อได้รับ Nak^a จากการรับเลือด หรือปลูกถ่ายอวัยวะ หรือตั้งครรภ์ เมื่อผู้ป่วยมีแอนติบอดีชนิดนี้แล้วอาจเกิดปัญหาทางคลินิกหลายประการ เช่น ภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion refractoriness; PTR) (Fujino et al. 2001: 42-44 ; Xu et al. 2013: 1199-1206) ปัญหาเกล็ดเลือดต่ำในทารกในครรภ์และแรกคลอด ซึ่งเป็นผลมาจากแอนติเจน Nak^a ของลูกถูกทำลายจาก anti-Nak^a ในกระแสเลือดแม่ (Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia; FNAIT) (Taketani et al. 2008: 70-74 ; Kankirawatana et al. 2001: 375-377 ; Curtis, Ali and Glazier. 2002: 1173-1179 ; Xu et al. 2013: 1199-1206), post transfusion purpura (PTP) (Bierling et al. 1995: 777-782 ; Morishita et al. 2005: 803-806) และ transfusion-related acute lung injury (TRALI) (Nakajima et al. 2008: 318-323 ; Hayashi and Hirayama. 2011: 380–390) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า CD36 เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อมาเลเรียชนิด Plasmodium falciparum และการเป็น receptor ต่อ oxidize LDL ซึ่งพบว่าเกี่ยวข้องกับภาวะน้ำหนักเกิน เบาหวาน โรคหลอดเลือดและ

หัวใจ (Martin et al. 2011: 36-42 ; Liu et al. 2011: 34-39.; Xie et al. 2009:13353-13358) ในประเทศไทยเคยมีรายงานผู้ป่วยที่มีภาวะ FNAIT จาก anti-Nak^a (Kankirawatana et al. 2001: 375-377) แต่ยังมีรายงานผู้ป่วยจากภาวะอื่นๆ ที่เกิดจากมี anti-Nak^a น้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดเรื่องวิธีการตรวจที่ค่อนข้างยุ่งยาก และมีห้องปฏิบัติการในการตรวจวิเคราะห์น้อย

Nak^a negative หรือ CD36 deficiency พบได้ 4-8% ในประชากร African, 3-4% ในประชากรญี่ปุ่น, ประมาณ 2.4% ในประชากร African American, 0.3% ของชาว Caucasians (Tomiyama et al. 1990: 684-687 ; Lee et al. 1999: 873-879) และพบประมาณ 2% ในประชากรจีน (Xu et al. 2014: 557-564) ทั้งนี้การศึกษาหาแอนติเจน Nak^a negative หรือ CD36 ในประเทศไทยยังมีจำนวนน้อยมาก Urwijitaroon Y และคณะได้เคยทำการศึกษา Nak^a แอนติเจนในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามี Nak^a negative 2.28% (Urwijitaroon, Barusrux, Romphruk and Puapairoj. 1995: 868-870), Kazuya Omi และคณะได้รายงาน polymorphism ของยีน CD36 ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* พบว่า ผู้ที่เป็น cerebral malaria 3% เป็น CD36 deficiency จากสาเหตุที่มีการขาดหายไปของเบสสองเบสบน exon 5 ของยีน *CD36* ตำแหน่ง 539-540 (539delAC) (Omi et al. 2002: 1-4) ปัจจุบันได้เปลี่ยนเป็น 329-330 delAC ซึ่งเป็น variant ที่พบได้บ่อยในประชากรแถบเอเชีย การศึกษา variant ของยีน CD36 ส่วนใหญ่พบว่า คนที่เป็น CD36 deficiency มักเกิดจาก variant 329-330delAC (539delAC) และ 1228-1239del12bp (Xu et al. 2014: 557-564 ; Xu et al. 2013: 1199-1206 ; Omi et al. 2002: 1-4)

ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษา variant ของยีน CD36 ของคนไทยทั่วไป หรือผู้บริจาคโลหิตที่สุขภาพแข็งแรง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาแอนติเจน CD36 (Nak^a) และ variant ของยีน CD36 ของผู้บริจาคโลหิตไทยที่เป็น CD36 deficiency เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของยีน CD36 ในคน

ไทย สำหรับการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต และสามารถพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองโดยการตรวจใน DNA ของผู้บริจาคโลหิตหรือผู้ป่วย ซึ่งจะนำมาพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจน Nak^a ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจคัดกรองหา Nak^a negative (CD36 deficiency) ในผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
2. เพื่อศึกษา variants ของยีน CD36 ที่เป็นสาเหตุของ Nak^a negative (CD36 deficiency)
3. เพื่อแยกชนิดของ Nak^a negative (CD36 deficiency) และศึกษาความสัมพันธ์กับ variant ชนิดต่างๆ

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการตรวจหา Nak^a (CD36) บนเกล็ดเลือด และเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ ของผู้บริจาคเกล็ดเลือด ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยใช้วิธี flow cytometry จากนั้นนำ DNA ของผู้บริจาคที่มีผล Nak^a negative (CD36 deficiency) ตรวจดูลำดับเบสของยีน CD36 ด้วยวิธี DNA sequencing และวิเคราะห์หา variant ของยีน CD36

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความถี่ของ Nak^a negative (CD36 deficiency) ของผู้บริจาคโลหิต ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ
2. ทำให้ทราบ variants ของยีน CD36 ที่อาจเป็นสาเหตุของ Nak^a negative (CD36 deficiency) ที่พบได้ในประชากรไทย

3. นำข้อมูล variants ของยีน CD36 ที่ตรวจพบไปพัฒนาการตรวจด้วยเทคนิค PCR หรือเทคนิคอื่นๆ เพื่อนำมาใช้เป็นงานประจำได้

4. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการศึกษาวิจัยอื่นๆ ต่อไป

บทที่ 2

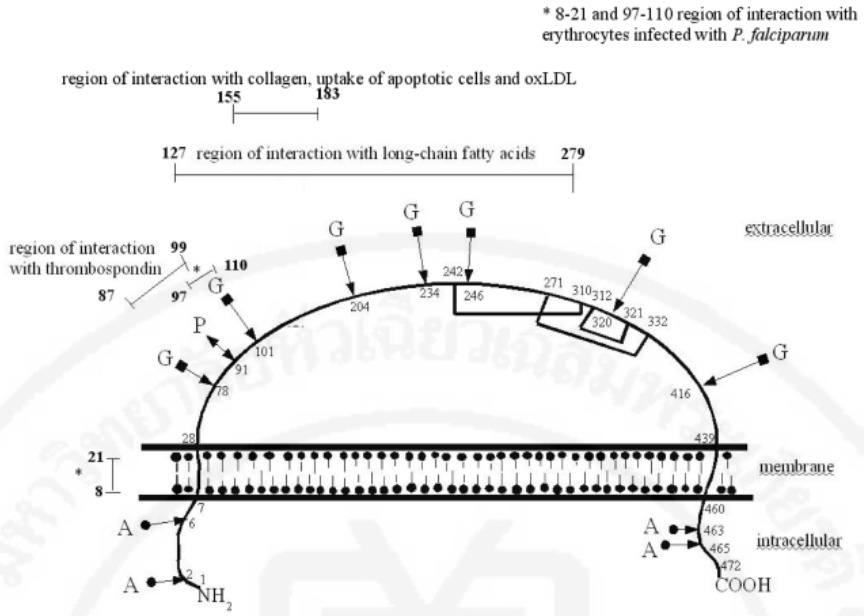
ทบทวนวรรณกรรม

CD36 เป็น major glycoprotein (GP) ชนิดหนึ่งบนผิวเกล็ดเลือด อาจเรียกอีกอย่างว่า glycoprotein IV (GPIV) หรือ glycoprotein IIIb (GPIIIB) (Rać, Safranow and Poncyljusz. 2007: 288-296 ; Xu et al. 2014: 557-564) และยังนิยมเรียกว่า Nak^{a} ตามการตรวจพบแอนติบอดีต่อ Nak^{a} (CD36) รายแรกในคนญี่ปุ่น (Ikeda et al. 1989: 213-217) นอกจากนั้นยังพบ CD36 บนเซลล์อื่นๆ เช่น monocytes, microvascular endothelial cell, macrophage, early erythroid cells, vascular smooth muscle cell, epidermal cell และ culture cell lines บางชนิด (Knowles et al. 1984: 2170-2173 ; Tandon et al. 1989:7570-7575) CD36 มีบทบาทในกระบวนการหลายอย่าง (Multi-function) ได้แก่ กระบวนการ platelet aggregation ทำหน้าที่เป็น receptor ให้แก่ collagen และ thrombospondin แต่ในคนที่เป็น CD36 deficiency ยังสามารถเกิด platelet aggregation ได้ตามปกติ ทั้งนี้เพราะยังมี molecule อื่นๆ สามารถทำหน้าที่นี้ได้ นอกจากนั้นยังมีบทบาทในกระบวนการ platelet adhesion, signal transduction และ hematopathology (Greenwalt et al. 1992: 1105-15) มีหลายการศึกษาพบว่า CD36 มีความสัมพันธ์กับภาวะอ้วน และ ไขมันสูง เนื่องจาก CD36 บน monocyte และ macrophage มีหน้าที่กำจัด oxidized LDL จาก plasma ซึ่งทำให้เกี่ยวข้องกับโรค artherosclerosis, diabetes, tumor angiogenesis (Martin et al. 2011: 36-42 ; Collot-Teixeira et al. 2007: 468-477) นอกจากนั้น CD36 ยังกระตุ้นการเกาะติดของเม็ดเลือดแดงที่มีรูปร่างผิดปกติ เช่น ติดเชื้อปรสิต

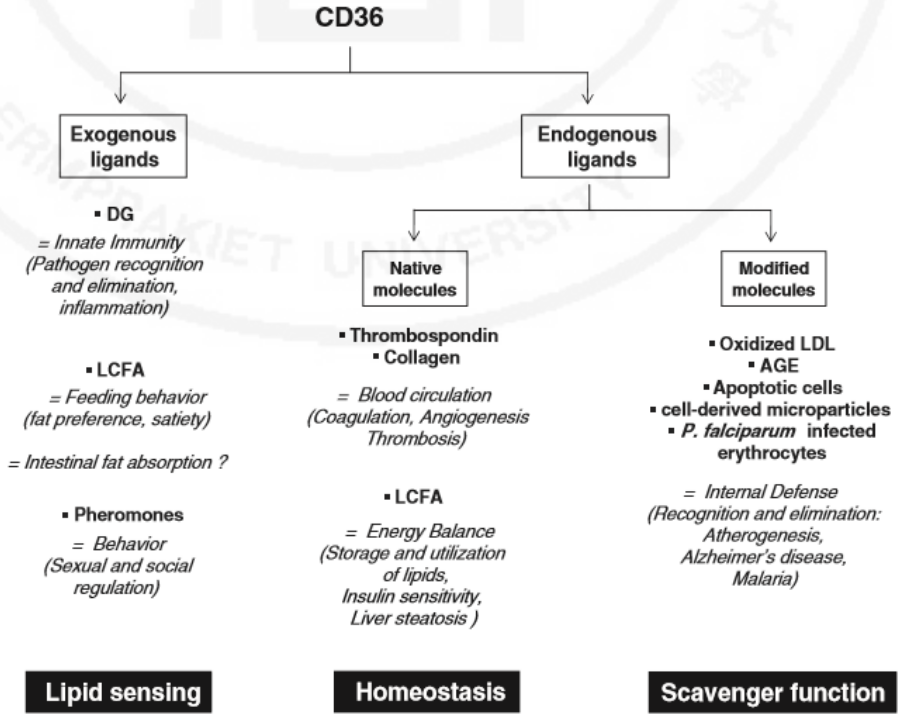
Plasmodium falciparum หรือ เกี่ยวข้องกับ hemoglobin S (Omi et al. 2002: 1-4 ; Oquendo et al. 1989: 95-101) ภาพจำลอง CD36 และการทำงานอื่นๆ ของ CD36 ดังแสดงในภาพที่ 1 และ 2

Molecular biology ของ CD36

CD36 หรือ Glycoprotein IV เป็น membrane glycoprotein ขนาด 88 kDa จัดอยู่ในกลุ่ม Scavenger receptor Type B family เป็นไกลโคโปรตีนที่มีความต้านทานต่อเอนไซม์ protease Human CD36 gene เป็นยีนขนาดใหญ่ 309.7 kb บน band q 11.2 ของโครโมโซมคู่ที่ 7 ประกอบด้วย 15 exons ในจำนวนนี้ 12 exons เป็น coding region คือ exon ที่ 3-14 ส่วนอีก 3 exons เป็น non coding regionไม่มีการแปลรหัสได้แก่ exon 1, 2 และ 15 แต่ทำหน้าที่ coding N-terminal และ C-terminal domain ของ CD36 protein ใน exon 3 มี 89 nucleotide อยู่ในส่วน 5'-UTR และ encode ส่วน cytoplasmic และ transmembrane domain ส่วนด้าน 3'-UTR อยู่ในส่วน exon 14 หรือ อยู่ทั้งใน exon14 และ 15 ในบางเซลล์ (Rać, Safranow and Poncyljusz. 2007: 288-296)



ภาพที่ 1 CD36 protein และ receptor sites (Rać, Safranow and Poncyljusz. 2007: 288-296)



ภาพที่ 2 Flow chart การทำงานของ CD36 (Martin et al. 2011: 36-42)

Variant ของยีน CD36

มีรายงาน variant ของยีน CD36 ที่ทำให้เกิดการสร้างโปรตีน CD36 น้อยลง หรือไม่มีการสร้างโปรตีนนี้เลย ในแต่ละเชื้อชาติอาจมี การผันแปรของยีนต่างๆ กันทำให้เกิด variant หรือ polymorphism ของยีนที่แตกต่างกัน มีรายงาน polymorphism มากกว่า 20 sites ที่ทำให้เกิด CD36 deficiency type I ส่วน CD36 deficiency type II มี molecular mechanism ที่ซับซ้อนและอาจมี genetic regulatory อื่นๆ ร่วมด้วยซึ่งยังไม่มีการอธิบายกลไกการเกิดได้อย่างชัดเจน ตัวอย่างชนิดของ variant ที่เคยมีรายงาน (Rać, Safranow and Poncyljusz. 2007: 288-296) ดังได้แสดงในตารางที่ 1

มีการศึกษา ยีน CD36 ในประชากรจีนเชื้อสายต่างๆ พบ variant แตกต่างกันบางตำแหน่ง เช่น การศึกษาของ Xianguo Xu และคณะ ศึกษา polymorphism ยีน *CD36* ในชาวจีน Han พบว่า มี polymorphism กว่า 22 sites ในจำนวนนี้มีที่เคยรายงานแล้ว 17 sites และที่พบใหม่อีก 5 sites ได้แก่ 111A>T, 681C>A, 1172-1183 del12b, 1236delT และ 1395A>C จากการศึกษานี้ polymorphism ที่พบมากที่สุดคือ 329-330delAC (539delAC) และ 1228-1239del12bp (Xu et al. 2014: 557-564) การศึกษาของ Ruishu Li และคณะ ศึกษา polymorphism ยีน *CD36* ชาวจีนใน Shanghai จำนวน 1022 คน พบว่ามี CD36 deficiency 22 ราย (2.2%) เป็น type I 0.2% และ type II 2% โดยใน type I พบว่ามี polymorphism แบบ 329-330delAC 1 ราย และ 371C>T ใน exon14 ซึ่งเป็นตำแหน่งใหม่ 1 ราย ส่วน type II พบว่าส่วนใหญ่เป็น 1228-1239del12bp และ 329-330delAC (Li et al. 2015: 666-673) การศึกษาของ Xiuzhang Xu และคณะการศึกษา polymorphism ของยีน *CD36* ชาวจีนตอนใต้ พบว่ามี CD36 deficiency 18 รายจากทั้งหมด 998 คน (1.8 %) มี polymorphism ที่พบมากที่สุดคือ 1228-1239del12bp และ 329-330delAC และพบ mutation ใหม่ดังนี้ C220T, 429+4insg, 1200-

5inv49bp, 429+4insg, 121-126delgCAAGTT (Xu et al. 2013: 1199-1206) สำหรับ variant ของยีน *CD36* ในคนไทยจากการศึกษาของ Kazuya Omi และคณะ ได้ศึกษา *CD36* ในผู้ป่วยโรคมาลาเรียในประเทศไทย พบว่าในผู้ป่วย cerebral malaria 3% พบว่าเป็น CD36 deficiency แบบที่มี polymorphism 539delAC (329-330delAC) ใน exon 5 ของยีน *CD36* (Omi et al. 2002: 1-4)

ตารางที่ 1 ข้อมูล Exon, Intron และ mutation ที่พบบนยีน *CD36* (Rać, Safranow and Poncyljusz. 2007: 288-296)

Exon	Next intron length	mRNA nucleotides	Amino acid encoded	Change in nucleotide sequence (variant)	Change in amino acid sequence
1	7341	-289 to -184	None	Del exons 1-3	No expression of CD36
2	470	-183 to -90	None	Del exons 1-3	No expression of CD36
3	9679	-89 to +120	1-40	Del exons 1-3	No expression of CD36
4	4362	121-281	41-94	C268T	Pro90Ser
5	1779	282-429	282-429	319-324delGCTGAG 329-330delAC (539delAC) G367A C380T T411C	Inframe del AA 107-8 Frameshift at AA 110 Glu123Lys Ser127Leu Ala137Val
6	1236	430-609	144-203	560insT	Frameshift at AA187
7	1945	610-701	204-234	619-624delACTGCA/insAAAAC 691-696delAAAGGT	Frameshift at AA207 Inframe del AA231-232
8	3463	702-748	234-250	-	-
9	954	749-818	250-273	T760C	Phe254Leu
10	757	819-1006	273-336	845-849delACGTT 949insA T975G	Frameshift at AA282 Frameshift at AA317 Tyr325Term

11	729	1007-1125	336-375	T1079G	Leu360Term
12	511	1126-1199	376-400	Del tttagAT 1140-1146 delTTTACAA/insCCAAA G1150C+1155delA	Skipping exon12 Frameshift at AA380 Ala384Pro+ Frameshift at AA385
13	573	1200-1254	401-418	Del tattacagAG Dupl.1204-1246 1218-1224delGAGGAAC 1228-1239 delATTGTGCCTATT A1237C	Skipping exon 13 Frameshift at AA416 Frameshift at AA406 Deletion of Ile-Val-Pro-Ile Ile413Leu
14	2236	1255-1688	419-472	-	-
15	-	1420-2044	None	-	-

ภาวะพร่อง CD36 (CD36 deficiency)

CD36 deficiency หรือ Nak^{a} negative คือการขาดหายไปของโปรตีน CD36 บางส่วนหรือขาดหายไปทั้งหมด ซึ่งเกิดจากมีการแปรผันของยีน *CD36* เกิดจาก variant หรือ polymorphism ของยีน ทำให้การสร้าง CD36 ลดลงหรือไม่สร้างเลย พบได้ 4-8% ของประชากร Africans; 3-4% ในประชากรญี่ปุ่น; ประมาณ 2.4% ในประชากร African Americans; 0.3% ของ Caucasians; ประมาณ 2% ของประชากรจีน; 2.3 % ในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ 4.12% ของประชากรอินโดนีเซีย (Lee et al. 1999: 873-879 ; Xu et al. 2014: 557-564 ;

Urwijitaroon et al. 1995: 868-870 ; Li et al. 2015: 666-673 ; Xu et al. 2013: 1199-1206 ; Curtis, Aster et al. 1996: 331-334 ; Lin, Shieh and Yang. 1993: 155-157 ; Santoso and Kiefel.1993: 739-741) ในคนที่เป็น CD36 deficiency หรือ Nak^a negative เมื่อได้รับแอนติเจน Nak^a จากการตั้งครรภ์ รับเลือด หรือปลูกถ่ายอวัยวะ จะสามารถสร้างแอนติบอดีต่อ CD36 ได้หรือเรียกว่า anti-Nak^a ซึ่งแอนติบอดีจะก่อให้เกิดอาการทางคลินิกหลายอย่าง เช่น เกิดภาวะ platelet transfusion refractoriness (PTR) คือการให้เกล็ดเลือดแล้วไม่ตอบสนอง ปริมาณเกล็ดเลือดไม่เพิ่มตามเกณฑ์ เนื่องจากผู้ป่วยมี anti-Nak^a (Tomiyama et al. 1990: 684-687), post transfusion purpura การที่ผู้ป่วยมี anti-Nak^a แล้วได้รับเกล็ดเลือดที่มีแอนติเจน Nak^a จึงถูกระบบภูมิคุ้มกันร่างกายผู้ป่วยทำลายเกล็ดเลือดทั้งของผู้บริจาคและยังทำลายเกล็ดเลือดตัวเองได้ จึงมีจุดเลือดออกและจ้ำเลือดกระจายตามร่างกาย, neonatal alloimmune thrombocytopenia การที่แม่มีแอนติบอดี anti-Nak^a ลูกมีแอนติเจนทำให้เกิดการทำลายเกล็ดเลือดของลูก เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำและมีอาการอื่นๆ ตามมา (Taketani et al. 2008: 70-74 ; Kankirawatana et al. 2001: 375-377; Bierling et al. 1995: 777-782), Transfusion-related acute lung injury (TRALI) เนื่องจาก anti-CD36 (anti-Nak^a) ต่อ monocytes ซึ่งสามารถแทรกซึมผ่านเข้ามาในชั้นของ microvascular endothelail cell ได้ จนทำให้เกิด edema และทำให้เม็ดเลือดขาวชนิด PMN มีการเคลื่อนที่มาบริเวณนี้มากขึ้น จึงทำให้มีการอักเสบเพิ่มขึ้น ดังนั้น anti-Nak^a antibody อาจมีความเกี่ยวข้องกับการสูญเสียหน้าที่ของ microvascular endothelail cell (Nakajima et al. 2008: 318-323 ; Hayashi and Hirayama. 2011: 380–390)

CD36 deficiency แบ่งออกเป็น 2 types ได้แก่ CD36 deficiency Type I คือไม่มีการแสดงออกของ CD36 ทั้งบนเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ พบเพียง 10% ของคนที่เป็น CD36 deficiency

และCD36 deficiency Type II ไม่มีการแสดงออกของ CD36 เฉพาะบนเกล็ดเลือด แต่ยังพบได้ในเซลล์อื่น เช่น monocytes (Yamamoto et al. 1994: 392-397) พบว่ามี 90% ของคนที่เป็น CD36 deficiency จากการศึกษาพบว่า Type I สามารถกระตุ้นให้สร้าง anti-Nak^{a} ทำให้เป็นสาเหตุของการเกิดอาการทางคลินิกต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมา เคยมีรายงานสาเหตุของ CD36 deficiency Type I เกิดจาก homozygous mutation หรือ compound heterozygous ของอัลลีล หรือเรียกอีกอย่างว่า CD36 null อัลลีลที่พบว่าเป็นสาเหตุส่วนใหญ่คือ C268T, 949insA และ 329-330delAC โดยเฉพาะ C268T มีรายงานว่าพบเป็นสาเหตุใน Asian มากถึง 50% ของอัลลีลทั้งหมด ส่วนสาเหตุของ Type II เกิดจาก heterozygous mutation ส่วนใหญ่จะเป็น C268T (Xu et al. 2014: 557-564) จากงานวิจัยของ Kashiwagi และคณะ พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่เป็น CD36 Deficiency Type II ที่เกิดจาก heterozygous mutation ของ C268 และ T268 เมื่อตรวจ cDNA จาก monocyte ในขณะที่ใน cDNAของ platelet พบว่ามีเพียง T268 (Kashiwagi et al. 1995: 1040-1046)

ความสัมพันธ์ของ CD36 กับการติดเชื้อ *Plasmodium falciparum*

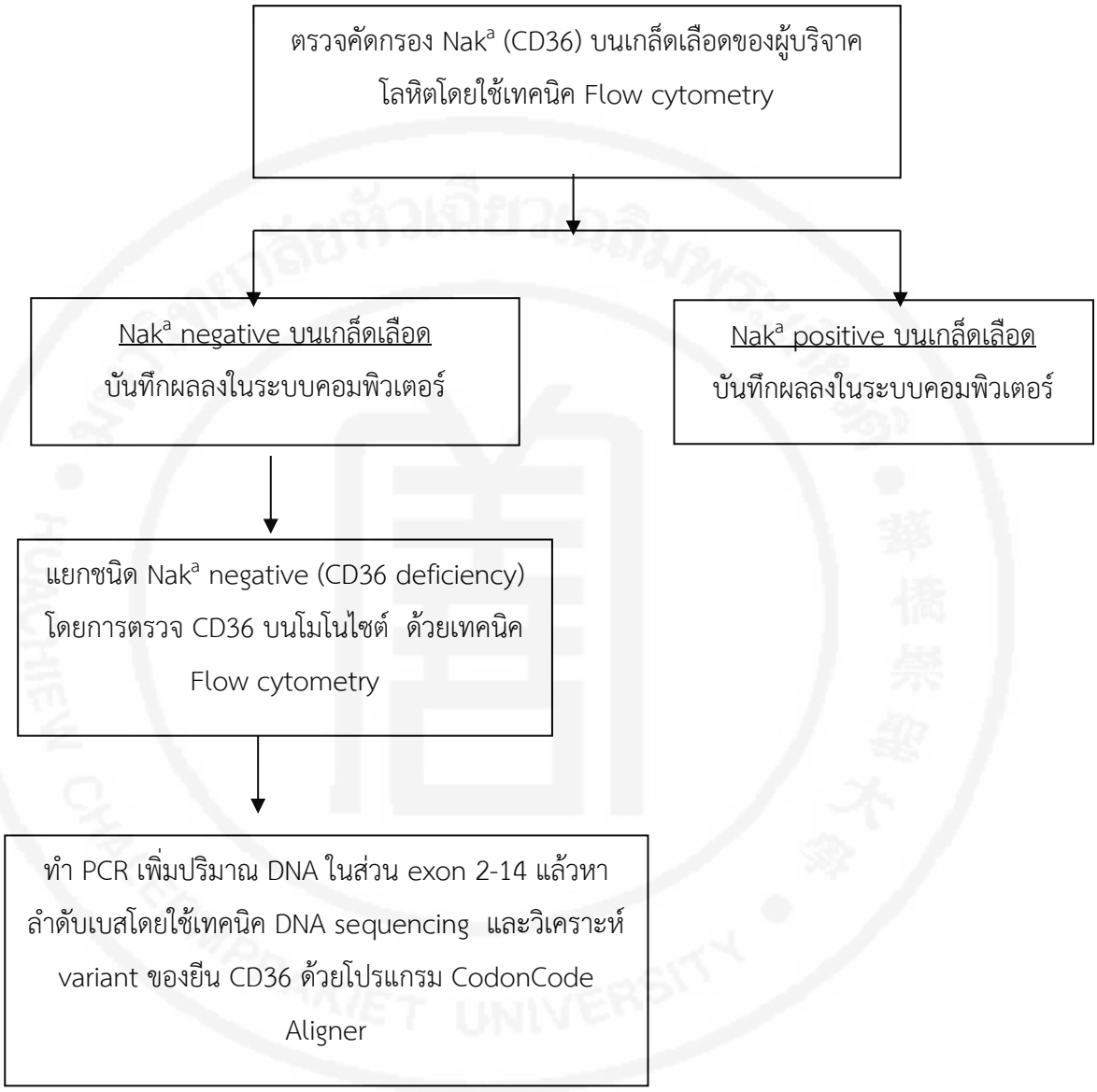
CD36 จัดเป็น receptor อย่างหนึ่งสำหรับปรสิต *Plasmodium falciparum* เข้าสู่เซลล์โดยมี binding site อยู่บริเวณตำแหน่ง amino acid 146-164 ในคนที่พร่อง CD36 เชื้อนี้เข้าสู่เซลล์เม็ดเลือดแดงไม่ได้ ถือว่าเป็น protective allele ป้องกันการติดเชื้อ แต่หากมีความบกพร่องแบบ type II อาจไม่สามารถป้องกันได้ (Hirano et al. 2003: 136-144) ดังในงานวิจัยที่ศึกษาของ Kazuya Omi และคณะ ได้ศึกษา polymorphism ของ CD36 ในผู้ป่วยโรคมาลาเรียในประเทศไทย ตรวจพบ variant แบบ 539delAC (329-330 delAC) ใน exon 5 ของยีน CD36 ของผู้ป่วยที่มีอาการมาลาเรียขึ้นสมอง (cerebral malaria) 3% [11] โดยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาพบว่า

539delAC เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยพร่อง CD36 โดยพบในผู้ป่วยประเทศญี่ปุ่นและจีน ซึ่งจากงานวิจัยพบผู้ป่วยโรคมาลาเรียในประเทศไทยมี variant 539delAC ซึ่งทำให้เกิด CD36 deficiency ทั้งในเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ (CD36 deficiency Type I) จึงอาจทำให้ลดความสามารถในการ opsonization ของ monocyte และ macrophage ที่จะตอบสนองต่อปรสิต *Plasmodium falciparum* ที่บุกรุกเข้ามาในเม็ดเลือดแดงได้ เชื้อจึงเพิ่มจำนวนแพร่กระจายมากทำให้ผู้ป่วยโรคมาลาเรียเกิดอาการที่รุนแรงกว่าคนที่ไม่มีอัลลีลนี้ได้ (Omi et al. 2002: 1-4)

CD36 ทำหน้าที่เป็น lipid sensor

มีงานวิจัยจำนวนมากสนับสนุนว่า CD36 เกี่ยวข้องกับการนำ lipid ที่ผ่านกระบวนการย่อยเข้าสู่เซลล์ จึงมีชื่อเรียก CD36 อีกอย่างว่า Plasma membrane lipid-binding protein หรือ Fatty acid translocase (FAT) โดยตำแหน่งที่ทำหน้าที่ receptor บน CD36 คือ ectodomain (amino acid 155-183) จับกับ oxidized low density lipoprotein (OxLDL) (Martin et al. 2011: 36-42 ; Collot-Teixeira et al. 2007: 468-477) และตำแหน่ง 127-279 เป็นตำแหน่งสำหรับจับ long-chain fatty acids (Rać, Safranow, and Poncyljusz. 2007: 288-296) CD36 จึงมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะอ้วน และเป็น insulin resistance ทำให้เกิดโรคทาง metabolic syndrome ได้ เช่น เบาหวานชนิดที่ 2 coronary heart disease และเนื่องจาก CD36 เป็น receptor สำหรับ OxLDL จึงเป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคหลอดเลือดและโรคหัวใจ atherosclerotic cardiovascular disease จากการสร้าง foam cell โดย macrophages ในคนที่เป็น CD36 deficiency จึงลดความเสี่ยงการเกิด atherosclerotic cardiovascular disease และภาวะ metabolic syndrome อื่นๆ (Aitman. 2001: 651-652 ; Latisha et al. 2008: 1695–1704)

กรอบแนวคิดการทำวิจัย



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ระเบียบวิธีวิจัยในงานวิจัยนี้ ประกอบไปด้วย ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย เกณฑ์ในการคัดเลือกตัวอย่างเข้าทำการวิจัย เกณฑ์การคัดออกตัวอย่าง การคิดจำนวนตัวอย่างที่ใช้ศึกษา การขอจริยธรรมการวิจัย เครื่องมืออุปกรณ์ และน้ำยาที่ใช้ วิธีการตรวจและแปลผล

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรเป็นผู้บริจาคเกล็ดโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กลุ่มตัวอย่างคือ ผู้บริจาคเกล็ดโลหิตที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์คัดเข้า

เกณฑ์ในการคัดเลือกตัวอย่าง (Inclusion criteria)

จัดทำโดยการคัดเลือกผู้บริจาคเลือดชนิด single donor platelet ชาวไทยที่มีอายุอยู่ระหว่าง 18-50 ปี และเก็บตัวอย่างตรวจที่เป็น platelet cell ที่ได้หลังจากการทำ apheresis แล้วและนำมาตรวจสอบข้อมูล donor ID โดยใช้ข้อมูลของ donation number จากฉลากที่ติดอยู่บนหลอดตัวอย่างและบันทึกลงทะเบียนตัวอย่างในระบบคอมพิวเตอร์

เกณฑ์ในการคัดออกตัวอย่าง (Exclusion criteria)

ตัวอย่างที่มี donor ID ซ้ำกับตัวอย่างทดสอบเดิม หรือเป็นผู้บริจาคเลือดชนิด single donor platelet ที่มีอายุเกิน 50 ปี

การคำนวณ N

$$n_o = \frac{p_0 q_0 (z_{1-\alpha} + z_{1-\beta}) \sqrt{\frac{p_1 q_1}{p_0 q_0}}}{(p_1 - p_0)^2}$$

N= 500

p_0 = 0.02 (prevalence of Nak^a negative in Thai ประมาณ 2 %) [10]

p1 = 0.015, α=0.10, $Z_{1-\alpha}$ = 1.282,

β = .20, $Z_{1-\beta}$ = .842

จากสูตรคำนวณ n_0 = 3,174

ปรับ $n = n_o/1+n_o/N$ = 431.8

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.1 ตัวอย่างควบคุม

เกล็ดเลือด และ DNA ที่ทราบชนิด CD36 หรือ Nak^a

3.1.2 การเลือกตัวอย่าง

ตัวอย่างทดสอบได้แก่ เกล็ดเลือดของผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่บริจาคเลือดชนิด single donor platelet เพื่อนำตัวอย่าง platelet cell หลังจากการทำ platelet apheresis จัดเก็บในหลอดมาทดสอบต่อไป จำนวน 500 ตัวอย่าง และตัวอย่างทดสอบ EDTA blood เพื่อใช้เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และสกัด DNA ในรายที่ให้ผล Nak^a negative โดยมีเกณฑ์คัดเลือกตัวอย่างเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหา Nak^a phenotype

จริยธรรมการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมงานวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย หมายเลข 3/2558 (ตามเอกสารภาคผนวก ค)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์และน้ำยา

อุปกรณ์

1) High speed centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417C, Germany)
2) Centrifuge (MSE Falcon 6/300, UK)
3) Thermal cycler (MJ Research PTC-200, USA)
4) UV spectrophotometer (Shimadzu UV-1201, Japan)
5) Vortex mixer (Scientific Industries, USA)
6) Electropheresis (Advance co. Mupid, China)
7) UV transilluminator (California UVP BioDoc-It™system, USA)
9) Safety cabinet (Europeenne) (Flufrance, Wissons, France)
10) Adjustable automatic pipette (Gilson, France)
11) เครื่องชั่ง แบบ digital (Sartorius, Illinois, USA)
12) Microwave (BestPlus mo-140) (BestPhus, China)
13) Flow cytometer (FC500 MCL; Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)

น้ำยา และสารเคมี

1) Primers for PCR-SSP (Invitrogen™, USA)

2) Primers for DNA sequencing (WardMedic Ltd., Sigapore)

3) Gotaq® Green Master Mix (Promega, USA)

4) LE agarose (SeaKem® LE, U.S.A)

5) TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™ , USA)

6) Tris-Borate-EDTA (Ameresco, USA)

7) Ethidium bromide (Sigma, U.S.A)

8) 1X PBS-EDTA-BSA

9) 0.2% BSA+PBS/EDTA

10) 0.8% Sodium Hypochlorite

11) FITC Mouse IgG Isotype control (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA)

12) FITC labeled anti-human CD41 MoAbs (strain: P2) (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)

13) FITC labeled anti-human CD36 MoAbs (strain: FA6) (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)

14) Monoclonal antibody mouse IgG - FITC / monoclonal antibody mouse IgG – PE (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA)

15) Monoclonal antibody anti-human CD14 – PE (Biolegend, San Diego, CA, USA)

16) Steriled H2O

วิธีการตรวจหาแอนติเจน CD36 บนเกล็ดเลือดและ monocyte ด้วยวิธี flow cytometry

ขั้นตอนการเตรียมเกล็ดเลือด

1. เตรียมเกล็ดเลือดจากตัวอย่าง platelet concentrate ปริมาตร 250 μL
2. ล้าง 2 ครั้ง ด้วย 0.2% bovine serum albumin (BSA) + phosphate buffer saline (PBS)/EDTA ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 rpm เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที
3. จากนั้นเทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ได้ประมาณ 100×10^9 cells/μL ด้วย 0.2% BSA+PBS/EDTA

ขั้นตอนการย้อมด้วย monoclonal antibody

1. นำเกล็ดเลือดที่เตรียมได้ปริมาตร 50 μL ใส่ลงในหลอดที่ 1 และนำมาย้อมด้วย FITC Mouse IgG Isotype control (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) dilution 1:50 ปริมาตร 50 μL ใช้เป็น negative control ของเกล็ดเลือด
2. นำเกล็ดเลือดที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 μL ใส่ในหลอดที่ 2 แล้วนำมาย้อมด้วย FITC labeled anti-human CD41 MoAbs (strain: P2) (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) dilution 1:50 ปริมาตร 50 μL ใช้เป็น positive control ของเกล็ดเลือด
3. จากนั้นทดสอบตัวอย่างในหลอดที่ 3 (หลอด test) โดยใช้เกล็ดเลือดที่ต้องการตรวจฟีโนไทป์ ปริมาตร 50 μL มาย้อมด้วย FITC labeled anti-human CD36 MoAbs (strain: FA6) (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) dilution 1:20 ปริมาตร 50 μL
4. นำหลอดทั้งสาม incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที

5. ปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย buffer ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที
6. เทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วเติม 0.2% BSA+PBS/EDTA 500 μL นำไปวัดด้วยเครื่อง flow cytometer (FC500 MCL; Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)

วิธีการแปลผล

เมื่อเริ่มต้นทดสอบใหม่ในการแปลผลทุกครั้งจะอ่านผลของหลอด control ก่อน โดยหลอดที่ 1 (negative control) เซลล์เกล็ดเลือดในหลอดนี้ต้องไม่ติดสี FITC ส่วนในหลอดที่ 2 (positive control) เซลล์เกล็ดเลือดต้องติดสี FITC labeled anti-human CD41 McAbs (CD41 เป็น marker ของเกล็ดเลือด) และเพื่อใช้ดูการติดสีเกล็ดเลือดและกำหนดพื้นที่ตรวจนับเซลล์เกล็ดเลือด ในหลอดทดสอบอื่นๆ ที่ตรวจ CD36 บนเกล็ดเลือด หากมีการติดสี FITC อ่านผล positive แต่ถ้าไม่ติดสีให้ผล negative

ขั้นตอนการย้อม monocytes

1. นำตัวอย่างเลือด EDTA blood ที่ทราบชนิดเป็น CD36 positive เติมลงในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 ปริมาตรหลอดละ 50 μL
2. หลอดที่ 1 ย้อมด้วย monoclonal antibody mouse IgG - FITC / monoclonal antibody mouse IgG – PE (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) เป็น negative control
3. หลอดที่ 2 ย้อมด้วย monoclonal antibody anti-human CD14 – PE (Biolegend, San Diego, CA, USA) / monoclonal antibody anti-human CD36 – FITC (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) เป็น positive control

4. หลอดที่ 3 ใช้ตัวอย่าง EDTA blood ที่ต้องการทดสอบ CD36 ย้อมด้วย monoclonal antibody anti-human CD14 – PE (Biolegend, San Diego, CA, USA) / monoclonal antibody anti-human CD36 – FITC (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)
5. จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 20 นาที แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกด้วย lysing solution นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดอีก 10 นาที
6. จากนั้นปั่น 3,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วนsupernatants ทิ้ง แล้วปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วย 2% fetal calf + 1X PBS ที่ 3,000 rpm นาน 2 นาที
7. จากนั้นเทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วเติม 1% paraformaldehyde (PFA) 500 μL นำไปวัดด้วยเครื่อง flow cytometer โดยเลือกวิเคราะห์กลุ่มเซลล์โมโนไซต์ จากการติดสี CD14-PE

วิธีการแปลผล

เมื่อเริ่มต้นทดสอบใหม่ในการแปลผลทุกครั้งจะอ่านผลของหลอด control ก่อน ในหลอดที่ 1 (negative control) เซลล์เกล็ดเลือดในหลอดนี้ต้องไม่ติดสี FITC ส่วนในหลอดที่ 2 (positive control) เซลล์โมโนไซต์ต้องติดสี Mab anti-human CD14 – PE / Mab anti-human CD36 – FITC (CD14 เป็น marker ของโมโนไซต์) ส่วนในหลอดที่ 3 เป็นต้นไปเป็นหลอด test ทดสอบหา CD36 บนโมโนไซต์ ถ้าให้การติดสี CD14-PE และ CD36-FITC อ่านผลเป็น CD36 positive ถ้าติดสีเฉพาะ CD14-PE แต่ไม่ติดสี CD36-FITC ให้ผลเป็น CD36 negative บนโมโนไซต์

การตรวจวิเคราะห์หา variant ของยีน CD36

3.5.1 การเพิ่มปริมาณ DNA fragment ที่ต้องการด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ให้ผล flow cytometry เป็น CD36 deficiency โดยใช้ไพรเมอร์ตามตารางที่ 2 มีขั้นตอนการทำ PCR ใน exon ต่างๆ ดังแสดงตารางที่ 2 initial denaturation ที่ 96 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, ตามด้วย 35 cycles ของ 96 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที; 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที; 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, และ final extension of 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นตรวจ PCR product ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

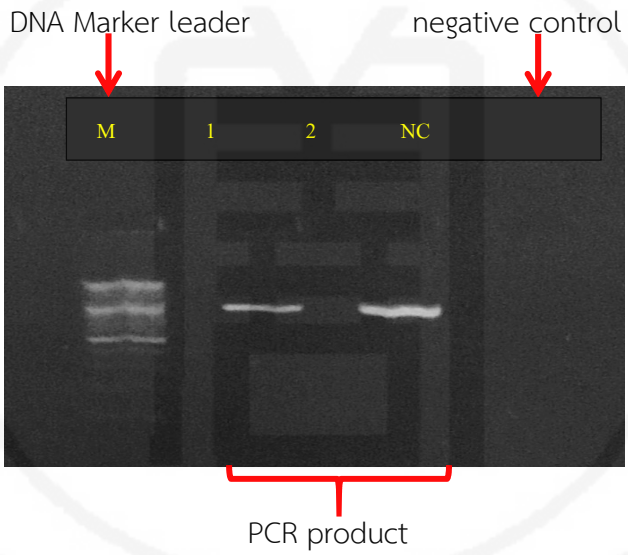
ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์สำหรับยีน CD36

CD36 gene	Primers	Sequences (5'-3')	Length (bp)	PCR product size (bp)
Exon2-3	E-23F	ATGGTGATATTAGAGAGTGT	20	1,070
	E-23R	TTTAAGACAGCAATGGAGTC	20	
Exon4	E-4F	GTAAAAGGCTAAAAAGACTG	20	672
	E-4R	ACTTCATAAACATAGGGAAG	20	
Exon5	E-5F	CCCCTTCTCGTTAGTTTGCT	20	707
	E-5R	TTTCTTACAGGCTGCGTTTG	20	
Exon6	E-6F	TTGTATTAAGCTCAATATTAGC	22	350
	E-6R	ATAAAATTATGCCTTGCC	18	
exon 7	E-7F	AAGTAACATTTTCCCATAC	19	187
	E-7R	ATGAATACTATTCCTGCT	18	
Exon8	E-8F	TGCAATAAGATAAAAGGTTC	20	356
	E-8R	AATTTTGTTGTGGGGATA	18	
Exon9	E-9F	GTATCCGCCTCCTGGGTGC	19	906
	E-9R	GCTTGGGCTCAAGGGTAGTG	20	
Exon10	E-10F	CAGAATGTAAGTTCAGGTT	19	268
	E-10R	GACTGTGCTACTGAGGTT	18	
Exon 11	E-11F	TAGACATATTACTGCCTGAA	20	485
	E-11R	AGGAAGAAATCGACCTAA	18	
Exon12	E-12 F	CCTTAAGTTACTACCTTCTC	20	201
	E-12 R	AATAACCATTTTCAAGAG	18	
Exon13	E-13F	TATTTCAGTTCCCCGAGA	18	463
	E-13R	TTTGTTCAATTGGATCAT	18	
Exon 14	E-14F	CTTGCCTTATAGATACTG	18	470
	E-14R	TACTTTAGTGATCTGCGT	18	

การอ่านผลและการแปลผล

การอ่านผล

การอ่านผลการตรวจโดยวิธี PCR พิจารณาความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของการทดลองจากการปรากฏของแถบ DNA Marker leader (M) และหลอดที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control; NC) จะต้องไม่ปรากฏแถบใดๆ ดังรูปภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงการอ่านผลปฏิกิริยา PCR

การแปลผล

ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ จะต้องมีอัลลีลที่จำเพาะกับไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ เมื่อถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต จะปรากฏแถบให้เห็น แสดงว่าตัวอย่างนั้นมีอัลลีลของ Exon นั้นๆ การแปลผลจะพิจารณาจากแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏว่ามีขนาดตรงกับขนาดของ PCR product ที่กำหนดหรือไม่ โดยดูขนาด PCR product ในตารางที่ 2

การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส

PCR product ที่ได้จากวิธีข้างต้น นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR Purification kit แล้วจึงทำการอ่านลำดับเบสด้วย เทคนิค DNA sequencing (ส่งวิเคราะห์บริษัท Macrogen, South Korea) ลำดับเบสที่ได้นำมาหา variant ด้วยโปรแกรม CodonCode Aligner โดยเปรียบเทียบข้อมูลกับ reference sequence ในฐานข้อมูลใน GeneBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) และส่งผลการวิเคราะห์ตรวจสอบโดยผู้เชี่ยวชาญ เพื่อยืนยันผล

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยประกอบไปด้วย 3 ส่วนได้แก่ ผลการตรวจหา CD36 (Nak^a) ด้วยวิธี flow cytometry ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอนเอ exon 2-14 ของยีน CD36 เพื่อตรวจ DNA sequencing และ ผลการหา variant ของยีน CD36 ในตัวอย่างดีเอนเอ CD36 deficiency

4.1 ผลการทดสอบตรวจหา CD36 (Nak^a) ด้วยวิธี flow cytometry

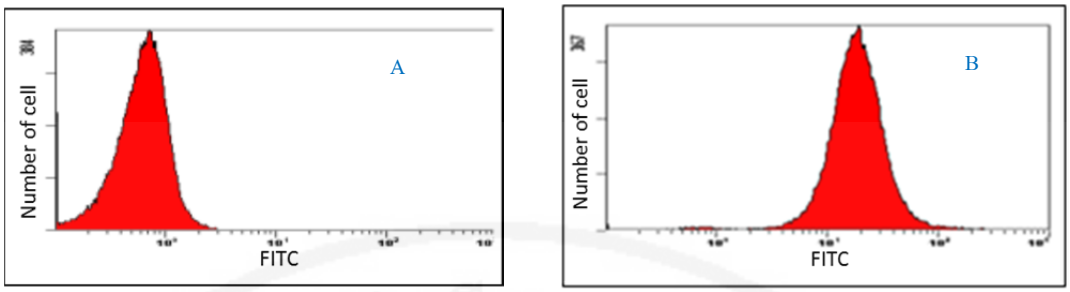
ทำการ validate วิธีการตรวจหาแอนติเจน CD36 บนเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ ด้วยวิธี flow cytometry ก่อนเริ่มทดสอบในตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยใช้ตัวอย่างผู้บริจาคที่ให้ทราบผล CD36 (Nak^a) positive และ negative บนเกล็ดเลือด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลถูกต้องทั้งหมด

ผลการตรวจหาแอนติเจน CD36 (Nak^a) บนเกล็ดเลือด ด้วยวิธี flow cytometry ในตัวอย่างเกล็ดเลือดผู้บริจาคที่มีหมู่เลือด O ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 598 ตัวอย่าง พบว่าให้ผล CD36 positive จำนวน 588 ตัวอย่าง คิดเป็น 98.33% และ ให้ผล CD36 negative (CD36 deficiency) จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.67% จากนั้นทำการตรวจแยกชนิด CD36 deficiency โดยตรวจหาแอนติเจน CD36 บนโมโนไซต์ในตัวอย่างผู้บริจาคที่ให้ผล CD36 negative จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าให้ผล negative จำนวน 1 ตัวอย่าง

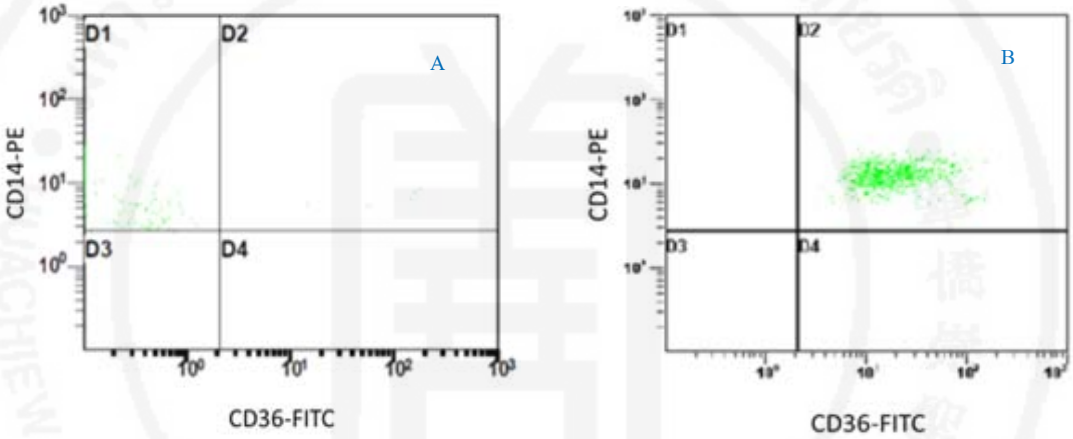
แปลผลเป็น CD36 deficiency type I และให้ผล positive จำนวน 9 ตัวอย่าง แปลผลเป็น CD36 deficiency type II รายละเอียดดังแสดงใน ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 4 และ 5

ตารางที่ 3 ผลการตรวจ CD36 (Nak^a) phenotyping โดยวิธี flow cytometry

CD36 (Nak^a) phenotyping	**จำนวน**	**เปอร์เซ็นต์**
CD36 positive	588	98.33
CD36 negative ▪ Type I ▪ Type II	10 ▪ 1 ▪ 9	1.67 ▪ 0.17 ▪ 1.50
ทั้งหมด	598	100.0



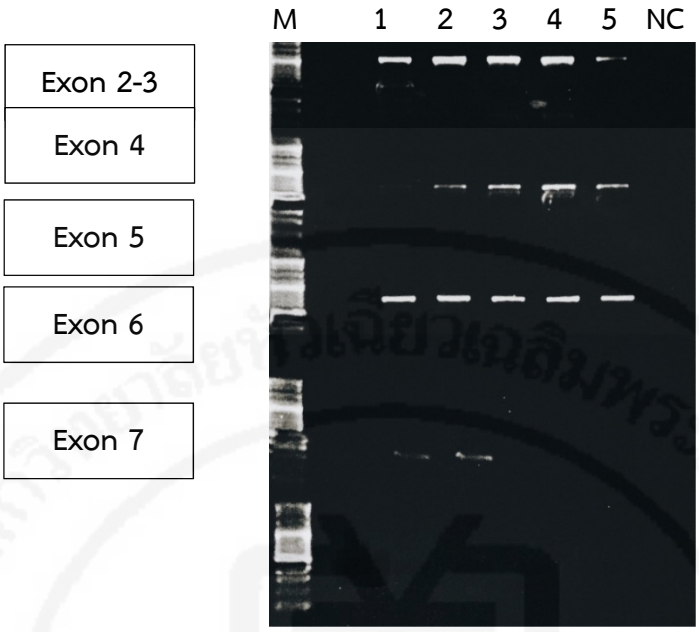
ภาพที่ 4 flow cytometry histogram ของเกล็ดเลือด CD36 negative (A) และ CD36 positive (B)



ภาพที่ 5 flow cytometry histogram ของโมโนไซต์ CD36 negative (A) และ CD36 positive (B)

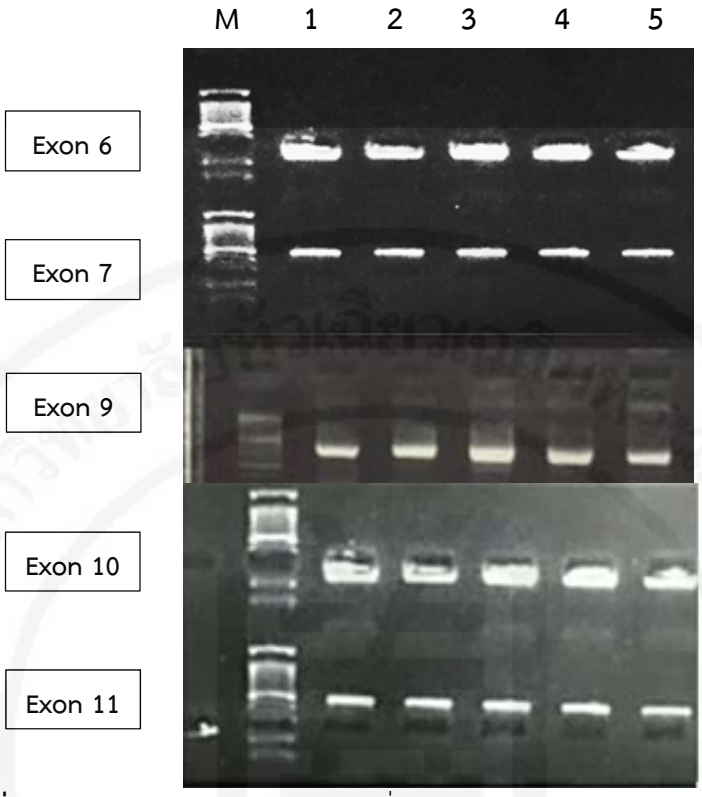
4.2 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหายีน CD36 ใน Exon ที่ 2-14 โดยวิธี PCR

ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ Exon ที่ 2-7 ของ CD36 โดยวิธีพีซีอาร์ โปรแกรมแรกที่ใช้ CD36P1 มี initial denaturation คือ 96°C 5 นาที, denaturation 96°c 30 วินาที, annealing 58°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที และ final extension 72°C 7 นาที ทั้งหมด 35 รอบ พบว่า Exon 2 – 5 ปรากฏแถบดีเอ็นขึ้น แต่ Exon 6 – 7 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น สรุปสภาวะที่เหมาะสมดังตารางที่ 4 และภาพที่ 6

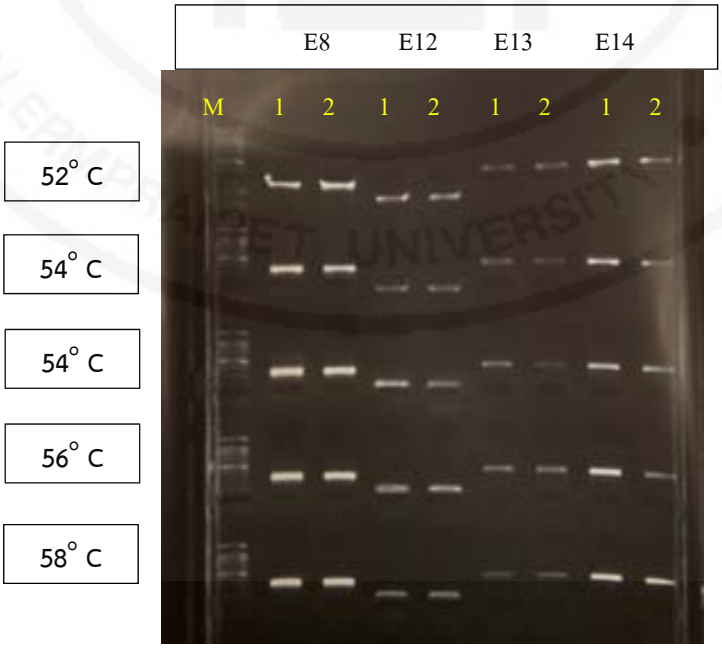


ภาพที่ 6 แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 2-7 Program CD36P1

ผู้วิจัยจึงได้ทำการเพิ่มอุณหภูมิช่วง annealing ในโปรแกรมที่สอง CD36P2 annealing 60°C พบว่า Exon 6 – 7 ยังไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการเพิ่มอุณหภูมิช่วง annealing อีกครั้งในโปรแกรมอื่นๆ คือ CD36P3- CD36P8 พบว่าโปรแกรมที่เหมาะสมคือ CD36P8 โดยเปลี่ยน annealing temperature เป็น 55°c พบว่า Exon 6 – 7 และ Exon 10-11 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น ส่วน Exon 8 และ 13– 14 ปรับสภาวะโดยใช้ gradient PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นดัง สรุปสภาวะที่เหมาะสมในตารางที่ 4 และรูปที่ 7 - 8



รูปที่ 7 แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 6 – 7 และ Exon 9-11 ใช้ annealing temperature เป็น 55°c



รูปที่ 8 แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 8 และ 12-14

ตารางที่ 4 โปรแกรม PCR ที่เหมาะสมในแต่ละ exon

Exon	PCR program
Exon 2-5	- Initial denaturation 96°C 5 นาที - denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 58°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที (ทั้งหมด 35 รอบ) - final extension 72 °C 7 นาที
Exon 6-7 และ 10-11	- Initial denaturation 96°C 5นาที - denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 55°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที (ทั้งหมด 35 รอบ) - final extension 72 °C 7 นาที
Exon 8, 12-14	- Initial denaturation 96°C 5นาที - denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 56°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที (ทั้งหมด 35 รอบ) - final extension 72 °C 7 นาที
Exon 9	- Initial denaturation 96ºC 5 นาที - denaturation 96ºC 30 วินาที, annealing 67ºC 45 วินาที, extension 72ºC 30 วินาที (ทั้งหมด 5 รอบ) - denaturation 96 ºC 30 วินาที, annealing 63 ºC 45 วินาที, extension 72 ºC 30 วินาที (ทั้งหมด 25 รอบ) - final extension 72 ºC 5 นาที

4.2 ผลการวิเคราะห์ DNA sequencing

การตรวจวิเคราะห์ผล DNA sequencing ของ exon ที่ 2 – 14 จากตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่มีภาวะ CD36 deficiency จำนวน 10 ราย ในส่วนของ พบ variant ใน exon 2-6, 9, 11 และ 14 แต่ไม่พบ variant ใน exon 7-8, 10, 12 และ 13 ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปภาพที่ 9

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ DNA sequencing ของ Exon ที่ 2 – 14

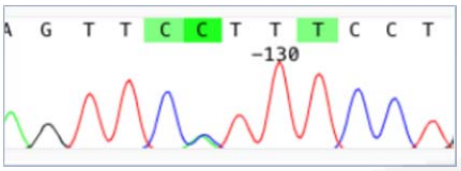
Location	mRNA	Amino acid	Mutation	Change in amino acid	Mutant sample	dbSNP number	ClinVar

Location	mRNA	Amino acid encoded	Mutation	Change in amino acid	Mutant sample	dbSNP number	ClinVar
Exon 2-3	-183 to + 120	1-40 amino acid encoded	c.80646139A>C	c.-132A>C: 5 prime UTR variant	No. 1,5,6,7,8,10 (A/C) No. 4,9 (CC)	rs1049654 A/C	Likely benign
Exon 9	749-811	250-273	c.80646921delA	c.120+67delT	No. 7 & No.9	rs3173802G>A	
			c.80646921delA	c.749-812G>A	No. 1,3,5,6,8,9,10 (G/A)		
			c.80647015C>T	c.120+155C>T	No.1-10	rs1527463 C/T	
			c.80646844A>G	c.104A>G	No.1		
Exon 4	121-281	41-94	c.80656534T>C	c.121-6T>C	No.1,3,5,6,7,8 (T/C) No. 2 (C/C)	rs3173798 C/T	Likely benign
			c.80656954C>G	c.281+254 C>G	No.1,2,3,5,6,7,8,10	rs3212165 C/G	
Exon 5	282-429	94-143	c.80661053A>G	c.282-10 A>G	No.1-10 (G/G)	rs3211892 A/G	Likely benign
			c.80661068G>C	c.287G>C, Arg96Pro	No.2 (G/C)	rs70961715 A/C/G	
			c.80661113_80661114delCA	c.332_333delCA, Thr111Serfs	No.4,6,9,10	rs1085307059 -/CA	Pathogenic (Platelet glycoprotein IV deficiency)
Exon 6	430-609	144-203	c.80663176A>G	c.609+7A>G	No.7 (A/G)	rs771055875 A/G	
Exon 7	610-701	204-234	-	-	-	-	
Exon 8	702-748	234-250	-	-	-	-	

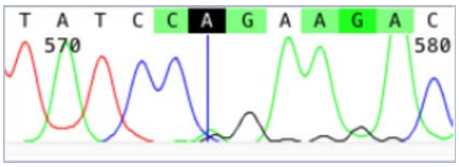
c. หมายถึง coding region หรือ coding base

					No.2 (A/A)		
			c.80669659C>A	c.749-294C>A	No.5		
			c.80669797G>A	c.749-156G>A	No.2 (A/A) No.1,3,5,6,8,9,10 (G/A)	rs3173803G>A	
			c.80669953C>A	c.749-77C>A	No.5	-	-
			c.80669673T>A	c.749-280T>A	No.2	-	-
			c.80669634T>G	c.749-319T>G	No.1,5 (T/G)	-	-
			c.80670010insT	c.806insT, Ser269Phefs	No.10	-	-
Exon 10	819-1006	273-336	-	-	-	-	-
Exon 11	1007-1125	336-375	c.80672053C>A	c.1125+13C>A	No. 1,2,5,6,8,10 (C/A)	rs3211942	
Exon 12	1126-1199	376-400	-	-	-	-	-
Exon 13	1200-1254	400-418	-	-	-	-	-
Exon 14	1255-1688	419-472	c.80673963G>A	c.1255-20G>A	No.2 (G/A)	rs753717189	Uncertain significance

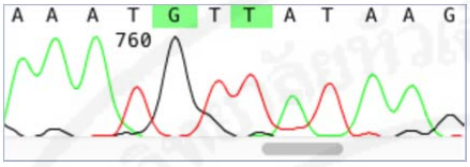
A) C.80646139A_C



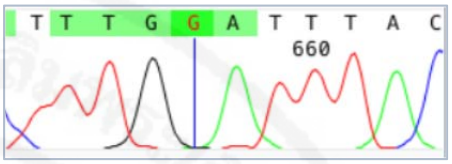
B) C.80646844A_G



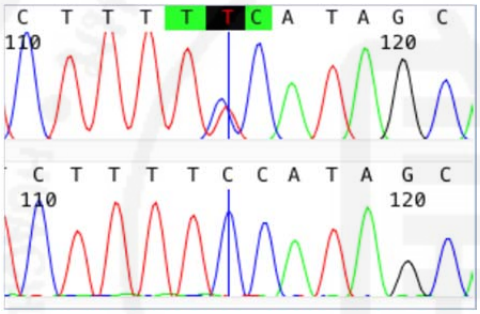
C) C.80647015C>T



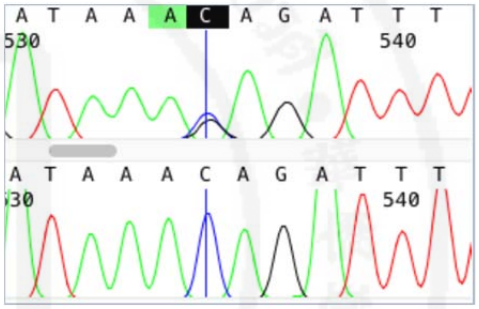
D) C.80646927delT



E) c.80656534T>C

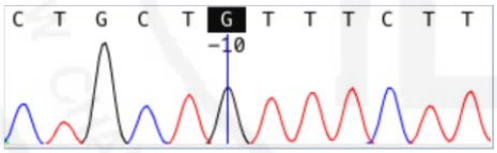


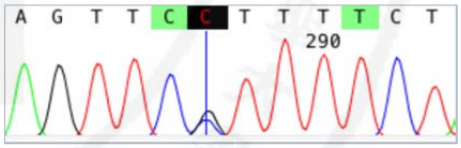
F) c.80656954C>G



G) c.80661053A>G

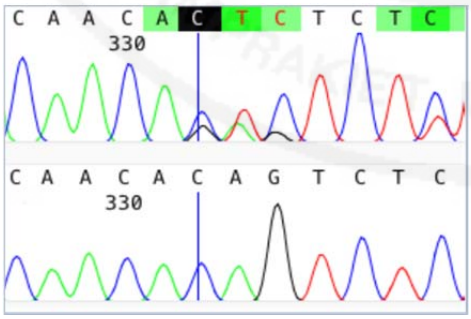
H) c.80661068G>C

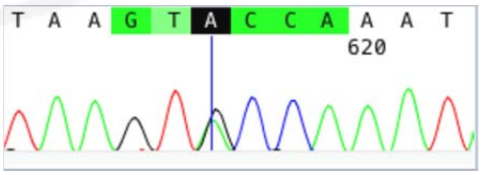




I) c.80661113_80661114delCA

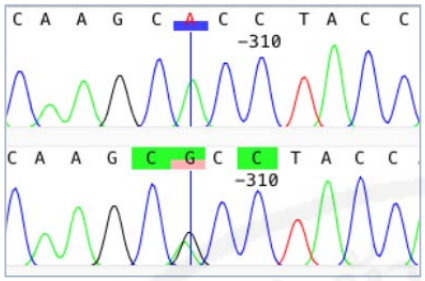
J) c.80663176A>G



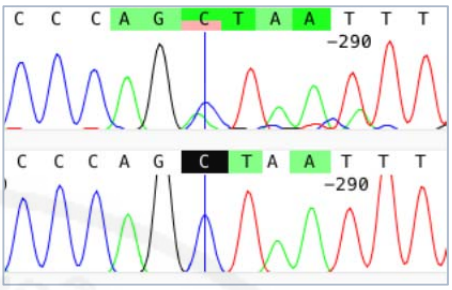


รูปที่ 9 ภาพ chromatogram ตำแหน่ง variant ของ exon 2-3 (A-D), Exon 4 (E-F), Exon 5 (G-I), Exon 6 (J)

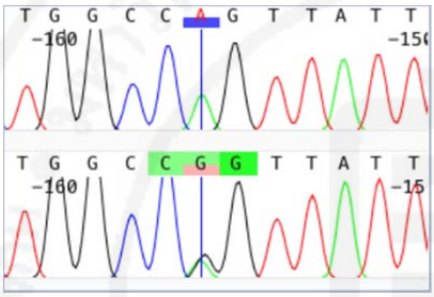
K) c. 80669641G>A



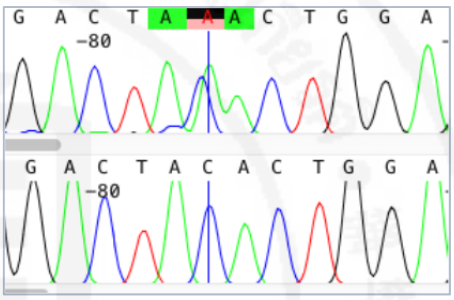
L) c.80669659C>A



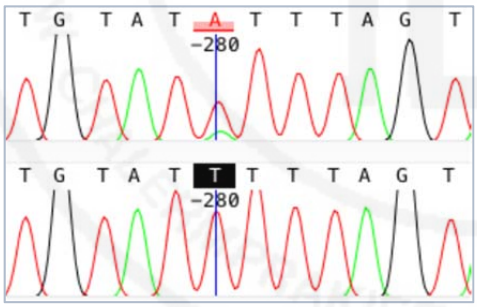
M) c.80669797G>A



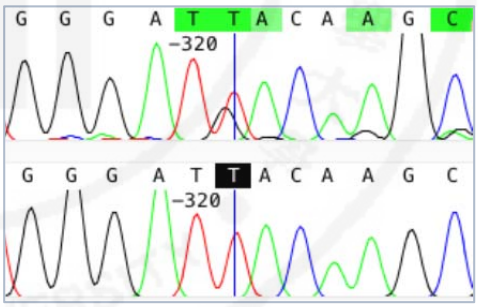
N) c.80669953C>A



O) c.80669673T>A

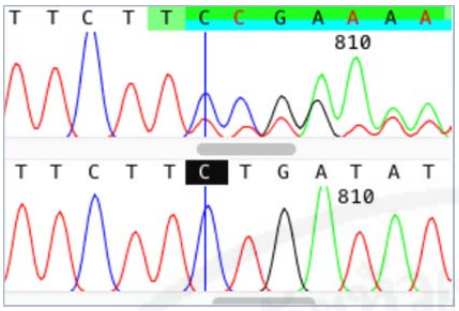


P) c.80669634T>G

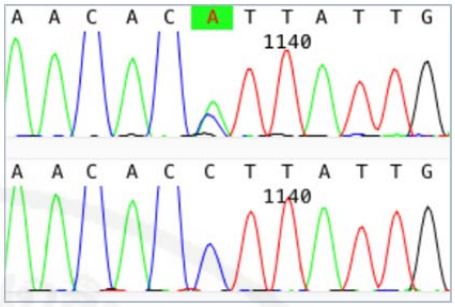


รูปที่ 9 (ต่อ) ภาพ chromatogram ตำแหน่ง variant ของ ของ exon 9 (K-Q), Exon 11 (R) และ Exon 14 (S)

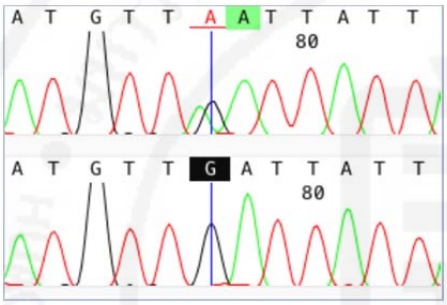
Q) c.80670010insT



R) c.80672053C>A



S) c.80673963G>A



รูปที่ 9 (ต่อ) ภาพ chromatogram ตำแหน่ง variant ของ ของ exon 9 (K-Q), Exon 11 (R) และ Exon 14 (S)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความถี่และชนิดของ CD36 deficiency ศึกษา variants ของยีน CD36 ที่เป็นสาเหตุของ Nak^{a} negative (CD36 deficiency) และเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของชนิด CD36 deficiency กับ variant ที่ตรวจพบ การศึกษานี้ทำการตรวจหาแอนติเจน CD36 (Nak^{a}) บนเกล็ดเลือดของผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จำนวน 598 ตัวอย่าง ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าการตรวจ CD36 บนเกล็ดเลือดให้ผลเป็น negative จำนวน 10 ตัวอย่าง (1.67 %) เมื่อนำมาตรวจหาแอนติเจน CD36 (Nak^{a}) บนโมโนไซต์ พบว่าเป็น CD36 deficiency type I จำนวน 1 ตัวอย่าง (0.17%) ให้ผล negative ทั้งบนเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ และให้ผลเป็น CD36 deficiency type II จำนวน 9 ตัวอย่าง (1.5%) ให้ผล negative เฉพาะบนเกล็ดเลือด แต่ให้ผล positive บนโมโนไซต์

เมื่อทำการศึกษา variant ของตัวอย่างที่เป็น CD36 deficiency ทั้ง 10 ราย โดยวิธี DNA sequencing และนำมาวิเคราะห์ variant เทียบกับลำดับเบสของ reference sequence โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ CodonCode Aligner ให้ผลดังนี้ พบ variant ใน exon 2-6, 9, 11 และ 14 แต่ไม่พบ variant ใน exon 7-8, 10, 12 และ 13 จากผลการวิเคราะห์ พบ variant ที่เคยมีรายงานความสำคัญทางคลินิก คือ 332-333delCA ซึ่งอยู่บน exon 5 ทำให้เกิด frameshift mutation ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 111 ในผล DNA sequencing จำนวน 4 ตัวอย่าง (No.4, 6, 9,10) ซึ่ง DNA No.4 เป็น CD36 deficiency type I และพบ variant ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน คือ

287 G>C ซึ่งอยู่บน exon 5 ทำให้มีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนจาก Arginine เป็น Leucine ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 96 ใน 1 ตัวอย่าง DNA ที่เป็น CD36 deficiency type II (No.2) และ variant ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่ง 269 บน exon 9 จาก Serine เป็น Phenylalanine คือ c.806insT ในตัวอย่าง DNA No.10 นอกจากนั้นยังพบว่า variant ส่วนใหญ่อยู่ในส่วน non-coding region (intron) ก่อนหรือหลังตำแหน่ง coding ได้แก่ c.-132A>C: 5 prime UTR variant, c.120+155C>T, c.121-6T>C, c.281+254 C>G, c.282-10 A>G และ variant ที่พบในตัวอย่างทุกตัวอย่าง คือ c.282-10 A>G (rs3211892 A/G)

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้พบว่าการตรวจ CD36 deficiency หรือ Nak^a negative จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.67 % จากจำนวน 598 ตัวอย่าง แยกชนิดของ CD36 deficiency ด้วยการตรวจ CD36 บนโมโนไซต์ พบว่าให้ผลเป็น CD36 deficiency type I จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.17% และให้ผลเป็น CD36 deficiency type II จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 1.5% ซึ่งมีความสอดคล้องใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Urwijitaroon Y. และคณะ พบว่ามี Nak^a negative 2.28% ในผู้บริจาคโลหิตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Urwijitaroon. 1990: 868-870) และการศึกษาในจีนพบความถี่ของ Nak^a negative ประมาณ 2% (Li. 2015: 666-673 ; Lin., Shieh., and Yang. 1993: 155-157 ; Xu et al. 2013: 1199-1206 ; Xu et al. 2014 : 557-564) ใกล้เคียงกับการศึกษาของ ความถี่ของ Nak^a negative ชาวมาเลเซีย จีน และอินเดีย ประมาณ 2-3% (Mohd et al. 2008: 60-65) แต่จากการศึกษานี้พบมีความถี่สูงกว่าประชากรชาว Caucasian ที่มี Nak^a negative 0.3% (Curtis and Aster. 1996 : 331-334) บ่งบอกว่าในชาวเอเชียรวมทั้งไทยมีโอกาสเกิดปัญหาจาก anti-Nak^a ได้สูงกว่าชาวผิวขาว ควรมีการวางแผนจัดทำทะเบียนผู้บริจาคที่มี Nak^a negative ไว้สำรอง ในกรณี

ที่ผู้ป่วยเป็น CD36 deficiency type I และสร้าง anti-Nak^{a} ขึ้นแล้ว จะไม่สามารถรับเกล็ดเลือดผู้บริจาคที่มี CD36 หรือ Nak^{a} ได้ เนื่องจากเมื่อให้เกล็ดเลือดนั้นเข้าไป เกล็ดเลือดจะถูกทำลาย ก่อให้เกิดปัญหา platelet transfusion refractoriness และการเกิดภาวะเลือดออกต่างๆ ตามมา ผู้ป่วยเหล่านี้ต้องได้รับเกล็ดเลือดจากผู้บริจาคที่เป็น CD36 deficiency หรือ Nak^{a} negative เท่านั้น ซึ่งพบในผู้บริจาคส่วนน้อย (2-3 %) หากมีการตรวจ CD36 ในผู้บริจาคและทำทะเบียนไว้แล้ว ก็จะสามารถช่วยเหลือผู้ป่วยได้อย่างทันท่วงที

การศึกษานี้พบ variant ที่อยู่ในทั้งส่วน coding region และ non-coding region ซึ่ง variant ในส่วน coding 3 แบบ คือ 287 G>C, 332-333delCA และ c.806insT ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโปรตีน CD36 จึงอาจก่อให้เกิดความผิดปกติ หรือเกิด damaged protein ขึ้น และพบว่า 287 G>C สอดคล้องกับงานวิจัยของ Xu และคณะ (Xu et al. 2014 : 557-564) ส่วน 332-333delCA และ c.806insT ยังไม่พบรายงานจากการศึกษาอื่นๆ จากการศึกษานี้ พบตัวอย่างที่เป็น CD36 deficiency type I จำนวน 1 ตัวอย่าง มี variant แบบ 332-333delCA แต่เนื่องจากพบเพียงแค่ 1 ตัวอย่างและพบ variant นี้ในตัวอย่างที่เป็น CD36 deficiency type II เช่นกัน จึงยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจน นอกจากนั้นพบว่ามี variant ในส่วนของ non-coding region (intron) ของ CD36 defficiency type II ส่วนใหญ่เป็น c.-132A>C ซึ่งอยู่ในก่อนถึงส่วน start codon สอดคล้องกับการศึกษาของ Xu และคณะ พบว่ามีการแสดงออกของ CD36 ลดลงเมื่อเทียบกับคนที่ไม่เป็น CD36 defficiency มีข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของ CD36 ในคนที่มี variant c.-132A>C ซึ่งทำหน้าที่เป็น cis-regulatory elements ในส่วน 5'-UTR ที่ควบคุมการแปลรหัสการสร้างโปรตีน CD36 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงจึงทำให้สร้างได้ลดลง (Xu et al. 2014 : 557-564 ; Kashiwagi et al. 1995: 1040-1046)

จากวิธีการตรวจฟีโนไทป์ของ CD36 ด้วยเทคนิค flow cytometry ที่ใช้ในการศึกษานี้ มีข้อดีคือมีความถูกต้องแม่นยำสูง และมีความไวในการตรวจสูง แต่มีข้อจำกัดคือน้ำยาและเครื่องมือมีราคาแพง ผู้ทำการทดสอบต้องมีความชำนาญในการตรวจ และต้องได้รับการฝึกฝนก่อนใช้เครื่องมือ แต่อย่างไรก็ดีวิธีนี้มีความเหมาะสมในการตรวจหาฟีโนไทป์ของ CD36 ในผู้ป่วยและผู้บริจาค เฉพาะห้องปฏิบัติการพิเศษที่มีเครื่อง flow cytometer เท่านั้น ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพงจึงมักเป็นการตรวจในห้องปฏิบัติการเฉพาะ หรือห้องปฏิบัติการพิเศษ จึงเป็นข้อจำกัดในการตรวจของห้องปฏิบัติการทั่วไป

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาในประชากรขนาดใหญ่ขึ้นและครอบคลุมประชากรทั้งหมดเพื่อสะท้อนให้เห็นถึง variant ของยีน CD36 ในประชากรไทยมากขึ้นและให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น และมีประโยชน์ต่อการหา CD36 negative เพื่อสำรองให้ผู้ป่วยในภาวะฉุกเฉินได้ดียิ่งขึ้น และหากพบ variant ที่เป็น common ในประชากรไทย สามารถนำข้อมูลมาประยุกต์ และพัฒนาชุดตรวจที่ใช้เทคนิค PCR-SSP หรือ real time PCR ได้ ซึ่งจะได้ผลที่รวดเร็วและราคาถูกกว่า วิธี flow cytometry และเป็นทางเลือกสำหรับห้องปฏิบัตการที่ไม่มีเครื่อง flow cytometer แต่มีเฉพาะเครื่อง PCR

บรรณานุกรม

Aitman T.J. (2001). "CD36, insulin resistance, and coronary heart disease" **Lancet.** 357(9257) : 651-652.

Bierling P., et al. (1995). "Posttransfusion purpura-like syndrome associated with CD36 (Naka) isoimmunization" **Transfusion.** 35(9) : 777-782.

Collot-Teixeira S., et al. (2007). "CD36 and macrophages in atherosclerosis" **Cardiovascular Research**. 75(3) : 468-477.

Curtis B.R., and Aster R.H. (1996). "Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians" **Transfusion**. 36(4) : 331-334.

Curtis B.R., Ali S., and Glazier A.M. (2002). "Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature" **Transfusion**. 42 : 1173-1179.

Fujino H., et al. (2001). "Primary refractoriness to platelet transfusion caused by Nak(a) antibody alone" **Vox Sanguinis**. 81(1) : 42-44.

Hayashi T and Hirayama F. (2015) "Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping" **Blood Transfusion**. 13(3) : 380–390.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Hirano K., et al. (2003). "Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency" **Trends in Cardiovascular Medicine**. 13(4) : 136-144.

Greenwalt D.E., et al. (1992). "Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine" **Blood**. 80(5) : 1105-1115.

Ikeda H., et al. (1989). "A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion" **Vox Sanguinis**. 57(3) : 213-217.

Kankirawatana S., et al. (2001). "Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-Nak(a)" **Transfusion**. 41 : 375-377.

Kashiwagi H., et al. (1995). "Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-->T substitution (proline90-->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency" **Journal Of Clinical Investigation**. 95 : 1040-1046.

Knowles D.M., et al. (1984). "Monoclonal anti-human monocyte antibodies OKM1 and OKM5 possess distinctive tissue distributions including differential reactivity with vascular endothelium" **The Journal of Immunology**. 132(5) : 2170-2173.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Lee K., et al. (1990). “CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans” **Transfusion**. 39(8) : 873-879.

Li R., et al. (2015). “Incidence and molecular basis of CD36 deficiency in Shanghai population” **Transfusion**. 55(3) : 666-673.

Lin M., Shieh S.H., and Yang T.F. (1993). “Frequency of platelet-specific antigens among Chinese in Taiwan” **Transfusion.** 33 : 155-157.

Liu H., et al. (2017). “CD36 is a candidate lipid sensor involved in the sensory detection of fatty acid in zebrafish” **Physiology & Behavior.** 182 : 34-39.

Love-Gregory L., et al. (2008). “Variants in the CD36 gene associate with the metabolic syndrome and high-density lipoprotein cholesterol” **Human Molecular Genetics.** 17(11) : 1695–1704.

Martin C., et al. (2011). “CD36 as a lipid sensor” **Physiology & Behavior.** 105(1) : 36-42.

Mohd I. A. et al. (2008). “Prevalence of CD36 Deficiency on Platelet among Malay, Chinese and Indian” **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences.** 9 : 60-65.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Morishita K., et al. (2005). "Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of fresh frozen plasma containing anti-CD36 (Nak) isoantibody" **Transfusion**. 45(5) : 803-806.

Nakajima F., et al. (2008). "Nishimara M, Hashimoto S, Okazaki H, Tadokoro K. Role of anti-Naka antibody, monocyte and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury" **Vox Sanguinis**. 95 : 318-323.

Omi K., et al. (2002). "Polymorphisms of CD36 in Thai malaria patients" **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** 33 Suppl 3 :1-4.

Oquendo P., et al. (1989). "CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes" **Cell.** 58(1) : 95-101.

Rać M.E., et al. (2007). "Molecular basis of human CD36 gene mutations" **Molecular Medicine**. 13(5-6) : 288-296.

Santoso S., and Kiefel V. (1993). "Frequency of platelet-specific antigens among Indonesians" **Transfusion**. 33 : 739-741.

Taketani T., et al. (2008). "Neonatal isoimmune thrombocytopenia caused by type I CD36 deficiency having novel splicing isoforms of the CD36 gene" **European Journal Of Haematology**. 81(1) : 70-74.

บรรณานุกรม (ต่อ)

Tomiyama Y., et al. (1990). "Identification of the platelet-specific alloantigen, Naka, on platelet membrane glycoprotein IV" **Blood**. 75(3) : 684-687.

Urwijitaroon Y., et al. (1990). "Frequency of human platelet antigens among blood donors in northeastern Thailand" **Transfusion**. 35(10) : 868-870.

Xie S, et al. (2009). "TR4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate CD36 expression and foam cell formation" **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 106(32) : 13353-13358.

Xu X., et al. (2013). "Studies on CD36 deficiency in South China: Two cases demonstrating the clinical impact of anti-CD36 antibodies" **Thrombosis and Haemostasis.** 110(6) : 1199-1206.

Xu X., et al. (2014). "Variants of CD36 gene and their association with CD36 protein expression in platelets" **Blood Tranfusion**. 12 : 557-564.

Yamamoto N., et al. (1994). "Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes" **Blood.** 83(2) : 392-397.

ภาคผนวก ก

ผลการตรวจ flowcytometry ทั้งหมด 598 ราย

Sample No.	Result	Sample No.	Result
1	positive	29	positive
2	positive	30	positive
3	positive	31	positive
4	positive	32	positive
5	positive	33	positive
6	positive	34	positive
7	positive	35	positive
8	positive	36	positive
9	positive	37	positive
10	positive	38	positive
11	positive	39	positive
12	positive	40	positive
13	positive	41	positive
14	positive	42	positive
15	positive	43	positive
16	positive	44	positive
17	positive	45	positive
18	positive	46	positive
19	positive	47	positive
20	positive	48	positive
21	negative	49	positive
22	positive	50	positive
23	positive	51	positive
24	positive	52	positive
25	positive	53	positive
26	positive	54	positive
27	positive	55	positive
28	positive	56	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
57	positive	90	positive
58	positive	91	positive
59	positive	92	positive
60	positive	93	positive
61	positive	94	positive
62	positive	95	positive
63	positive	96	positive
64	positive	97	positive
65	positive	98	positive
66	positive	99	positive
67	positive	100	positive
68	positive	101	positive
69	positive	102	positive
70	positive	103	positive
71	positive	104	positive
72	positive	105	positive
73	positive	106	positive
74	positive	107	positive
75	positive	108	positive
76	positive	109	positive
77	positive	110	positive
78	positive	111	positive
79	positive	112	positive
80	positive	113	positive
81	positive	114	positive
82	positive	115	positive
83	positive	116	positive
84	positive	117	positive
85	positive	118	positive
86	positive	119	positive
87	positive	120	positive
88	positive	121	positive
89	positive	122	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
123	positive	156	positive
124	positive	157	positive
125	positive	158	positive
126	positive	159	positive
127	positive	160	positive
128	positive	161	positive
129	positive	162	positive
130	positive	163	positive
131	positive	164	positive
132	positive	165	positive
133	positive	166	positive
134	positive	167	positive
135	positive	168	positive
136	positive	169	positive
137	positive	170	positive
138	positive	171	positive
139	positive	172	positive
140	positive	173	positive
141	positive	174	positive
142	positive	175	positive
143	positive	176	positive
144	positive	177	positive
145	positive	178	positive
146	positive	179	positive
147	positive	180	positive
148	positive	181	positive
149	positive	182	positive
150	positive	183	positive
151	positive	184	positive
152	positive	185	positive
153	positive	186	positive
154	positive	187	positive
155	positive	188	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
189	positive	222	positive
190	positive	223	positive
191	positive	224	positive
192	positive	225	positive
193	positive	226	positive
194	positive	227	positive
195	positive	228	positive
196	positive	229	positive
197	positive	230	positive
198	positive	231	positive
199	positive	232	positive
200	positive	233	positive
201	positive	234	positive
202	positive	235	positive
203	positive	236	positive
204	positive	237	positive
205	positive	238	positive
206	positive	239	positive
207	positive	240	positive
208	positive	241	positive
209	positive	242	positive
210	positive	243	positive
211	positive	244	positive
212	positive	245	positive
213	positive	246	positive
214	negative	247	positive
215	positive	248	positive
216	positive	249	positive
217	negative	250	positive
218	positive	251	positive
219	positive	252	positive
220	positive	253	positive
221	positive	254	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
255	positive	288	positive
256	positive	289	positive
257	positive	290	positive
258	positive	291	positive
259	positive	292	positive
260	positive	293	positive
261	negative	294	positive
262	positive	295	positive
263	positive	296	positive
264	positive	297	positive
265	positive	298	positive
266	positive	299	positive
267	positive	300	positive
268	positive	301	positive
269	positive	302	negative
270	positive	303	positive
271	positive	304	positive
272	positive	305	positive
273	positive	306	positive
274	positive	307	positive
275	positive	308	positive
276	positive	309	positive
277	positive	310	positive
278	positive	311	positive
279	positive	312	positive
280	positive	313	positive
281	positive	314	positive
282	positive	315	positive
283	positive	316	positive
284	positive	317	positive
285	positive	318	positive
286	positive	319	positive
287	positive	320	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
321	positive	354	positive
322	positive	355	positive
323	positive	356	positive
324	positive	357	positive
325	positive	358	positive
326	positive	359	positive
327	positive	360	positive
328	positive	361	positive
329	positive	362	positive
330	positive	363	positive
331	positive	364	positive
332	positive	365	positive
333	positive	366	positive
334	positive	367	positive
335	positive	368	positive
336	positive	369	positive
337	positive	370	positive
338	positive	371	positive
339	positive	372	positive
340	positive	373	positive
341	positive	374	positive
342	positive	375	positive
343	positive	376	positive
344	positive	377	positive
345	positive	378	positive
346	positive	379	positive
347	positive	380	positive
348	positive	381	positive
349	positive	382	positive
350	positive	383	positive
351	positive	384	positive
352	positive	385	positive
353	positive	386	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
387	positive	420	positive
388	positive	421	positive
389	positive	422	positive
390	positive	423	positive
391	positive	424	positive
392	positive	425	negative
393	positive	426	positive
394	positive	427	positive
395	positive	428	positive
396	positive	429	positive
397	positive	430	positive
398	positive	431	positive
399	positive	432	negative
400	positive	433	positive
401	positive	434	positive
402	positive	435	positive
403	positive	436	positive
404	positive	437	positive
405	positive	438	positive
406	positive	439	positive
407	positive	440	positive
408	positive	441	positive
409	positive	442	positive
410	positive	443	positive
411	positive	444	positive
412	positive	445	positive
413	positive	446	positive
414	positive	447	positive
415	positive	448	positive
416	positive	449	positive
417	positive	450	positive
418	positive	451	positive
419	positive	452	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
453	positive	486	positive
454	positive	487	positive
455	positive	488	positive
456	positive	489	positive
457	positive	490	positive
458	positive	491	positive
459	positive	492	positive
460	positive	493	positive
461	positive	494	positive
462	positive	495	positive
463	positive	496	positive
464	positive	497	positive
465	positive	498	positive
466	positive	499	positive
467	positive	500	positive
468	positive	501	positive
469	positive	502	positive
470	positive	503	positive
471	positive	504	positive
472	positive	505	positive
473	positive	506	positive
474	positive	507	positive
475	positive	508	positive
476	positive	509	positive
477	positive	510	positive
478	positive	511	positive
479	positive	512	positive
480	positive	513	positive
481	positive	514	positive
482	positive	515	positive
483	positive	516	positive
484	positive	517	positive
485	positive	518	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
519	positive	552	positive
520	positive	553	positive
521	positive	554	positive
522	positive	555	positive
523	positive	556	positive
524	positive	557	positive
525	positive	558	positive
526	positive	559	positive
527	positive	560	positive
528	positive	561	positive
529	positive	562	positive
530	positive	563	positive
531	positive	564	positive
532	positive	565	positive
533	positive	566	positive
534	positive	567	positive
535	positive	568	positive
536	positive	569	negative
537	positive	570	positive
538	positive	571	positive
539	positive	572	positive
540	positive	573	positive
541	positive	574	positive
542	positive	575	positive
543	positive	576	positive
544	positive	577	positive
545	positive	578	negative
546	positive	579	positive
547	positive	580	positive
548	positive	581	positive
549	positive	582	positive
550	positive	583	positive
551	positive	584	positive

Sample No.	Result	Sample No.	Result
585	positive	592	positive
586	positive	593	positive
587	positive	594	positive
588	positive	595	positive
589	negative	596	positive
590	positive	598	positive
591	positive	597	positive

ภาคผนวก ข
ผลงานตีพิมพ์

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาชนิด CD36 (Nak^a antigen) ในตัวอย่างผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

มยุรี เก่งเกตุ[1] อรรถพล ศรีสุดดี[2] ชาย ฤกษ์ชัย[2] กนกวรรณ รินบดี[2] ภาวิณี ดุปตวินทุ[2] ศิริลักษณ์ เพียรเจริญ[2]
นลินี จิตจักร[2] ศรีประไพ ขนุนทอง[2] อารยา ตัตวรร[2] และ สุชา จุลสำลี[1]
[1]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ [2]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

บทคัดย่อ

ความเป็นมา *CD36 หรือ Nak^a หรือ GPIV เป็นไกลโคโปรตีนบนเกล็ดเลือดและเซลล์อื่นๆ เช่น โมโนไซต์ และ endothelial cells จัดเป็น class B scavenger receptor คนที่เป็น CD36 deficiency (Nak^{a}negative) สามารถสร้าง anti-Nak^a เมื่อได้รับเลือด หรือตั้งครรภ์ ก่อให้เกิดปัญหาทางคลินิก โดยเฉพาะคนที่เป็น CD36 deficiency type I* ***วัตถุประสงค์*** *การศึกษานี้ได้ทำการตรวจฟีโนไทป์ของ CD36 (Nak^a) ในผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความสำคัญทางคลินิก* ***วิธีการศึกษา*** *ได้ดำเนินตรวจหา CD36 บนเกล็ดเลือดจำนวน 598 ตัวอย่าง และบนโมโนไซต์จำนวน 36 ตัวอย่าง เป็นผู้บริจาคที่ให้ผล CD36 บนเกล็ดเลือด negative จำนวน 6 ตัวอย่าง และ positive 30 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทุกรายทำการตรวจฟีโนไทป์ด้วย flow cytometry* ***ผลการศึกษา*** *จากการศึกษาตรวจหา CD36 บนเกล็ดเลือดพบว่าเป็น CD36 positive (Nak^a positive) จำนวน 588 ตัวอย่าง (98.33%) และเป็น CD36 deficiency (Nak^a negative) จำนวน 10 ตัวอย่าง (1.67%) และผลการตรวจหา CD36 บนโมโนไซต์ของตัวอย่างที่ให้ผล CD36 deficiency จำนวน 6 ตัวอย่างพบให้ผล positive จำนวน 5 ตัวอย่างเป็น CD36 deficiency type II และให้ผล negative จำนวน 1 ตัวอย่าง เป็น CD36 deficiency type I จากการศึกษานี้บ่งบอกได้ว่าแอนติเจน Nak^a อาจก่อให้เกิดปัญหาทางคลินิกในคนไทยได้*

คำสำคัญ : ● *CD36* ● *Nak^a antigen* ● *Thai blood donors*
วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2560;27:111-6.

ได้รับต้นฉบับ 9 มีนาคม 2560 รับลงตีพิมพ์ 18 พฤษภาคม 2560
ต้องการส่งบทความต้นฉบับติดต่อ ดร.มยุรี เก่งเกตุ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ถ.บางนา-ตราด กม.18 ต.บางโฉลง อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540 E-mail: mayuree.ke@gmail.com

Original Article

The Study of CD36 (Nak^a Antigen) Phenotype in Platelet Apheresis Donors of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Mayuree Kengkate[1], Atthaphol Srisuddee[2], Chai Roekchai[2], Kanokwan Chinbordee[2], Sirilak Phianoharoen[2], Pawinee Kupatawintu[2], Nalinee Jitjak[2], Sriprapai Khanuntong[2], Araya Tatawatorn[2] and Suoha Chulsomlee[1]

[1]Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University; [2]National Blood Centre, Thai Red Cross Society

Abstract:

Background: *CD36 or Nak^{a}or GPIV is a glycoprotein on platelet membrane and other cells such as monocytes and endothelial cells. CD36 is working as a class B scavenger receptor. CD36 deficiency (Nak^{a}negative) persons can produce anti-Nak^{a}when they receive blood transfusion or during pregnancy, especially CD36 deficiency type I.* ***Objective:*** *To study CD36 (Nak^a) phenotype in platelet apheresis donors of the National Blood Centre, Thai Red Cross Society in order to be used as a preliminary data in its clinical significance.* ***Methods:*** *This research studied CD36 on 598 platelet samples and 36 monocyte samples including 6 samples with CD36 negative on platelets and another 30 samples with CD36 positive on platelets obtained from platelet apheresis donors. All samples were phenotyped by flow cytometry.* ***Results:*** *CD36 positive (Nak^{a}positive) was found in 588 samples (98.33%) while CD36 deficiency (Nak^{a}negative) was found in 6 samples (1.67%). CD36 deficiency was found in 6 monocyte samples; CD36 deficiency type II was found in 5 samples and CD36 deficiency type I was found in 1 sample. This study indicates that Nak^a antigen may cause clinical problems in Thai population.*

Keywords : ● *CD36* ● *Nak^a antigen* ● *Thai blood donors*

J Hematol Transfus Med 2017;27:111-6.

บทนำ

CD36 หรือมีชื่อเรียก GPIV, GPIIIb, Nak^a และอื่นๆ เป็นไกลโคโปรตีนในกลุ่ม class B scavenger receptor นอกจากนี้ยังพบบนเซลล์อื่นๆ เช่น โมโนไซต์, endothelial cells, erythroblasts และ heart muscle cells เป็นต้น ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ CD36 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 ประกอบด้วย 15 exons[1] ในคนที่มี mutations บนยีน *CD36* บางตำแหน่งจะทำให้การแสดงออกของ CD36 บนเกล็ดเลือดลดลงหรือหายไป เรียกว่า CD36 deficiency หรือ Nak^a negative ซึ่งคนที่มี Nak^a negative จะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อ Nak^a (anti-Nak^a) ได้ เมื่อได้รับแอนติเจน Nak^a จากการรับเลือด หรือตั้งครรภ์ เมื่อผู้ป่วยมีแอนติบอดีชนิดนี้แล้วอาจเกิดปัญหาทางคลินิกหลายประการ เช่น ภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion refractoriness; PTR)[2] ปัญหาเกล็ดเลือดต่ำในทารกในครรภ์และแรกคลอด (fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia; FNAIT)[3,4] post transfusion purpura (PTP)[5] และ transfusion-related acute lung injury (TRALI)[6] นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า CD36 เป็น receptor ของ oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and long-chain fatty acids ซึ่งพบว่าเกี่ยวข้องกับภาวะน้ำหนักเกินและเบาหวาน[7] อีกทั้งยังเป็น receptor ต่อ thrombospondin, collagen และเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum*[8] ในประเทศไทยเคยมีรายงานผู้ป่วยที่มีภาวะ FNAIT จาก anti-Nak^a [9] แต่รายงานกรณีผู้ป่วยมีภาวะอื่นๆ ที่เกิดจากมี anti-Nak^a พบได้น้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดเรื่องวิธีการตรวจที่ค่อนข้างยุ่งยาก และห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้ ต้องส่งมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ reference laboratories

ความถี่ของแอนติเจน Nak^a negative หรือ CD36 deficiency ในประชากรชาติต่างๆ มีความแตกต่างกัน เช่น ชาว African พบได้ร้อยละ 4-9 ชาวญี่ปุ่นร้อยละ 3-4 ชาว African American ร้อยละ 2.4 ชาว Caucasians ร้อยละ 0.3[9-11] และพบประมาณร้อยละ 2 ในประชากรชาวจีน[12] การศึกษาในชาวไทยเคยมีรายงานของ Urwijitaroon และคณะ ทำการศึกษาแอนติเจน Nak^a ในคนไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่ามีแอนติเจน Nak^a negative ร้อยละ 2.28[11] แอนติเจน Nak^a negative หรือ CD36 deficiency สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามการขาดหายไปของแอนติเจนบนเซลล์ ได้แก่ CD36 deficiency type I คือชนิดที่ไม่พบ CD36 ทั้งบนเซลล์เกล็ดเลือดและโมโนไซต์ และ CD36 deficiency type II คือชนิดที่ไม่พบ CD36 บนเซลล์เกล็ดเลือดแต่พบบนโมโนไซต์ ซึ่งความสำคัญทางคลินิก Type I ทำให้เกิดการ alloimmunisation สร้างแอนติบอดีได้[13,14] ความถี่ของ CD36 deficiency แต่ละชนิด มีความแตกต่างกันไป เช่น รายงานการศึกษาของ Xu และคณะ ได้ศึกษาในผู้บริจาคโลหิตชาวจีน Han (Zhejiang) ที่มีสุขภาพดี พบความถี่ของ CD36 deficiency type I และ CD36 deficiency type II คือ 0.5 และ 1.3% ตามลำดับ[12] และจากรายงานของ Li และคณะ ได้ศึกษาในผู้บริจาคโลหิตชาวจีน (Shanghai) ที่มีสุขภาพดี พบความถี่ของ CD36 deficiency type I และ CD36 deficiency type II คือ 0.2 และ 2.0% ตามลำดับ[15] ทั้งนี้ยังไม่เคยมีการศึกษาของ CD36 deficiency ในชาวไทย รวมถึงการศึกษาทางโมเลกุลของยีน *CD36* การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษานำร่องเพื่อตรวจหาความถี่ของชนิด CD36 deficiency ในผู้บริจาคโลหิตชาวไทย

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย ตัวอย่างเกล็ดเลือดผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่เหลือใช้ในงานประจำจำนวน 598 ตัวอย่าง และตัวอย่างเลือดชนิด EDTA blood จำนวน 36 ตัวอย่าง จากผู้บริจาคที่มีผล CD36 บนเกล็ดเลือดเป็น negative จำนวน 6 ตัวอย่าง และผล positive จำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อทดสอบความถูกต้องวิธีการตรวจ งานวิจัยนี้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย หมายเลข 3/2558

การตรวจหาแอนติเจน CD36 บนเกล็ดเลือดและ monocyte ด้วยวิธี flow cytometry

การเตรียมเกล็ดเลือด

เตรียมเกล็ดเลือดจากตัวอย่าง platelet concentrate ปริมาตร 250 µL ล้าง 2 ครั้ง ด้วย 0.2% bovine serum albumin (BSA) + phosphate buffer saline (PBS)/EDTA ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที จากนั้นเทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ได้ประมาณ 100 x 10^6 cells/µL ด้วย 0.2% BSA+PBS/EDTA

ขั้นตอนการย้อมด้วย monoclonal antibody

ทำการทดสอบจำนวน 2 หลอด ประกอบด้วย หลอดที่ 1 (negative control) นำเกล็ดเลือดที่เตรียมได้ปริมาตร 50 µL มาย้อมด้วย FITC Mouse IgG Isotype control (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) dilution 1:50 ปริมาตร 50 µL และนำเกล็ดเลือดที่เตรียมไว้ ในหลอดที่ 2 ปริมาตร 50 µL มา

ย้อมด้วย FITC labeled anti-human CD41 MoAbs (strain: P2) (Beokman Coulter, Indianapolis, IN, USA) dilution 1:50 ปริมาตร 50 µL ใช้เป็น positive control ของเกล็ดเลือด จากนั้นทดสอบตัวอย่างในหลอดที่ 3 (หลอด test) โดยใช้เกล็ดเลือดที่ต้องการตรวจฟีโนไทป์ปริมาตร 50 µL มาย้อมด้วย FITC labeled anti-human CD36 MoAbs (strain: FA6) (Beokman Coulter, Indianapolis, IN, USA) dilution 1:20 ปริมาตร 50 µL นำหลอดทั้งสาม incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นล้าง 1 ครั้งด้วย buffer ที่ 3000 rpm เป็นเวลา 4 นาที 30 วินาที เทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วเติม 0.2% BSA+PBS/EDTA 500 µL นำไปวัดด้วยเครื่อง flow cytometer (FC500 MCL; Beokman Coulter, Indianapolis, IN, USA)

วิธีการแปลผล ในหลอดที่ 1 เซลล์เกล็ดเลือดในหลอดนี้ต้องไม่ติดสี FITC ใช้เป็น negative control ส่วนในหลอดที่ 2 เซลล์เกล็ดเลือดต้องติดสี FITC labeled anti-human CD41 MoAbs (CD41 เป็น marker ของเกล็ดเลือด) ใช้เป็น positive control การติดสีเกล็ดเลือดและกำหนดพื้นที่ตรวจจับเซลล์เกล็ดเลือด (หลอดที่ 1 และ 2 ทำการทดสอบเมื่อเริ่มต้นทดสอบใหม่) ส่วนในหลอดที่ 3 ที่ต้องการตรวจ CD36 บนเกล็ดเลือด หากมีการติดสี FITC อ่านผล positive แต่ถ้าไม่ติดสีให้ผล negative (Figure 1)

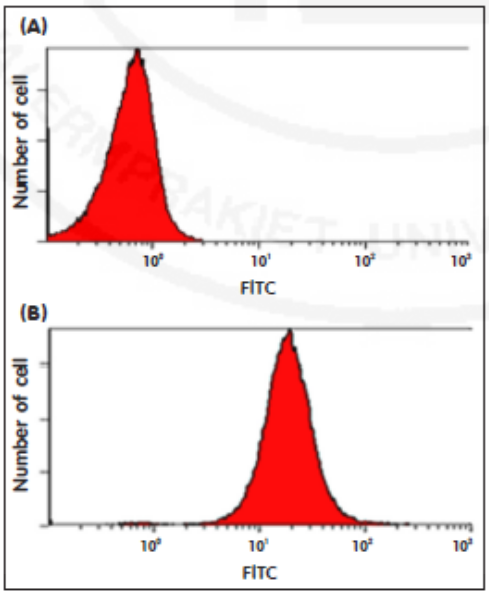


Figure 1 Flow cytometry histogram of CD36 negative (A) and CD36 positive (B) on platelet

ขั้นตอนการย้อม monocytes

นำตัวอย่างเลือด EDTA blood ที่ทราบชนิดเป็น CD36 positive เติมลงในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 ปริมาตรหลอดละ 50 µL หลอดที่ 1 ย้อมด้วย monoclonal antibody mouse IgG - FITC / monoclonal antibody mouse IgG - PE (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) เป็น negative control หลอดที่ 2 ย้อมด้วย monoclonal antibody anti-human CD14-PE (Biolegend, San Diego, CA, USA) / monoclonal antibody anti-human CD36 - FITC (Beokman Coulter, Indianapolis, IN, USA) เป็น positive control และหลอดที่ 3 ใช้ตัวอย่าง EDTA blood ที่ต้องการทดสอบ CD36 จำนวน 36 ตัวอย่าง ย้อมด้วย monoclonal antibody anti-human CD14-PE (Biolegend, San Diego, CA, USA) / monoclonal antibody anti-human CD36 - FITC (Beokman Coulter, Indianapolis, IN, USA) จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด 20 นาที แล้วทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกด้วย lysing solution นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดอีก 10 นาที จากนั้นปั่น 3,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทส่วน supernatant แล้วปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย 2% fetal calf + 1X PBS ที่ 3,000 rpm นาน 2 นาที จากนั้นเทส่วน supernatant ทิ้ง แล้วเติม 1% paraformaldehyde (PFA) 500 µL นำไปวัดด้วยเครื่อง flow cytometer โดยเลือกวิเคราะห์กลุ่มเซลล์โมโนไซต์ จากการติดสี CD14-PE

วิธีการแปลผล ในหลอดที่ 1 เซลล์เกล็ดเลือดในหลอดนี้ต้องไม่ติดสี FITC ใช้เป็น negative control ส่วนในหลอดที่ 2 เซลล์โมโนไซต์ต้องติดสี Mab anti-human CD14 - PE / Mab anti-human CD36 - FITC (CD14 ซึ่งเป็น marker ของโมโนไซต์) ใช้เป็น positive control (หลอดที่ 1 และ 2 ทำการทดสอบเมื่อเริ่มต้นทดสอบใหม่) ส่วนในหลอดที่ 3 เป็นต้นไปเป็นหลอด test ทดสอบหา CD36 บนโมโนไซต์ ถ้าให้การติดสี CD14-PE และ CD36-FITC อ่านผลเป็น CD36 positive ถ้าติดสีเฉพาะ CD14-PE แต่ไม่ติดสี CD36-FITC ให้ผลเป็น CD36 negative บนโมโนไซต์ (Figure 2)

ผลการศึกษา

จากการตรวจแอนติเจน CD36 (Nak') บนเกล็ดเลือดผู้บริจาคของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ จำนวน 598 ตัวอย่าง ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าให้ผล positive จำนวน 588 ตัวอย่าง (98.33%) และ ให้ผล negative จำนวน 10 ตัวอย่าง (1.67%) จากนั้นทำการตรวจหาแอนติเจน CD36 บนโมโนไซต์ในตัวอย่างผู้บริจาค

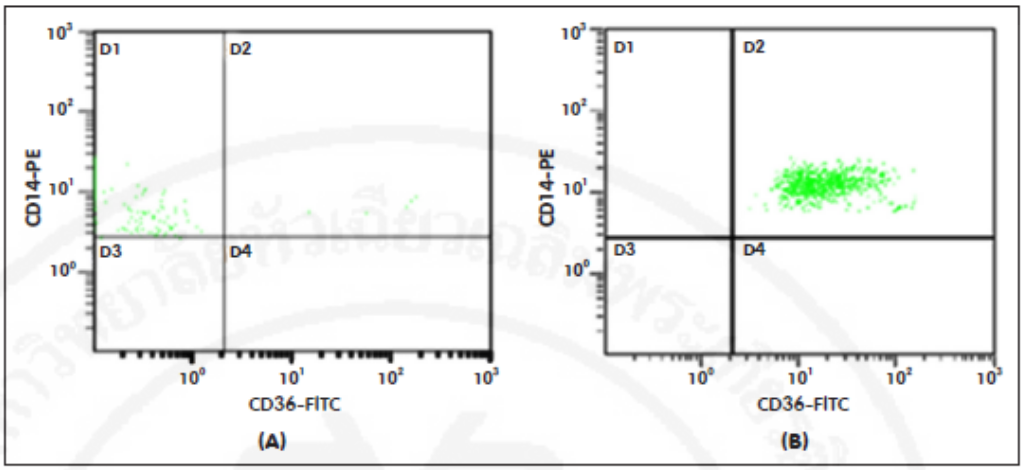


Figure 2 Flow cytometry scattergram of CD36 negative (A) and CD36 positive (B) on monocytes

ที่ให้ผล CD36 negative จำนวน 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าให้ผล negative จำนวน 1 ตัวอย่างแสดงว่าเป็น CD36 deficiency type I และให้ผล positive จำนวน 5 ตัวอย่างแสดงว่าเป็น CD36 deficiency type II รายละเอียดดังแสดงใน Table 1 และ Figures 1 และ 2

นอกจากนั้นได้ทำการ validate วิธีการตรวจหาแอนติเจน CD36 บน monocytes โดยใช้ตัวอย่างโมโนไซต์ผู้บริจาคที่ให้ผล CD36 (Nak^a) positive บนเกล็ดเลือด จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลถูกต้อง

Table 1 CD36 (Nak^a) phenotyping results in 598 samples

CD36 (Nak^a) phenotyping	Number	Percentage
CD36 positive	588	98.33
CD36 negative	10	1.67
▪ Type I	1	0.16
▪ Type II	5	0.84
▪ Not tested	4	0.67
Total	**598**	**100.0**

วิจารณ์

CD36 หรือ แอนติเจน Nak^a จัดเป็น class B scavenger receptor เมื่อมีการกระตุ้นให้สร้าง anti- Nak^a สามารถทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการทางคลินิกต่างๆ เช่น PTR, FNAIT, PTP และ TRALI[2-4] ความแตกต่างของการแสดงออกของแอนติเจนเกิดจากการมี mutations ในยีน *CD36* ทำให้ไม่มีการแสดงออกของ CD36 บนเซลล์ เรียกว่า CD36 deficiency หรือ Nak^a negative ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ CD36 deficiency type I ไม่มีการแสดงออกของ CD36 ทั้งบนเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ และ CD36 deficiency type II ไม่มีการแสดงออกของ CD36 เฉพาะบนเกล็ดเลือด ซึ่ง CD36 deficiency type I จะก่อให้เกิดปัญหาทางคลินิกจากการสร้างแอนติบอดีได้[11,14] ความถี่และชนิดของ CD36 deficiency (Nak^a negative) มีความแตกต่างกันตามเชื้อชาติ ซึ่งจากรายงานต่างๆ พบว่า CD36 deficiency (Nak^a negative) พบได้มากในชาวเอเชีย (2-10%) African (4-8%) และ African-American (2.4%) แต่พบได้ค่อนข้างน้อยในชาวผิวขาว (0.3%) จึงก่อให้เกิดปัญหาทางคลินิกในคนเอเชีย African และ African-American ได้มากกว่า[9-11,14,17]

จากการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความถี่และชนิดของ CD36 deficiency โดยตรวจหาแอนติเจน CD36 (Nak^a) บนเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ ของผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ จำนวน 598 ตัวอย่างด้วยวิธี flow cytometry พบว่าการตรวจ CD36 บนเกล็ดเลือดให้ผลเป็น negative จำนวน 10 ตัวอย่าง (1.67%) แต่สามารถติดตามตัวอย่างเลือดเพื่อหาชนิดของ CD36 deficiency จำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่า CD36 ให้ผล negative ทั้งบนเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ เป็น CD36 deficiency type I จำนวน 1 ตัวอย่าง ให้ผล negative เฉพาะบนเกล็ดเลือด เป็น CD36 deficiency type II จำนวน 5 ตัวอย่าง ทั้งนี้ไม่สามารถตรวจหา CD36 บนโมโนไซต์ได้ครบ 10 ตัวอย่าง เนื่องจากไม่มีตัวอย่างชนิด EDTA blood ของตัวอย่าง 4 รายที่เหลือ วิธีการตรวจฟีโนไทป์ของ CD36 ด้วยเทคนิค flow cytometry มีข้อดีคือมีความถูกต้องแม่นยำสูง และมีความไวในการตรวจสูง แต่

มีข้อจำกัดคือน้ำยาและเครื่องมือมีราคาแพง จึงมีความเหมาะสมในการตรวจหาฟีโนไทป์ของ CD36 ในผู้ป่วยและผู้บริจาคสำหรับห้องปฏิบัติการพิเศษที่มีเครื่อง flow cytometer จากผลการศึกษาพบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ในไทยของ Urwijitaroon Y. และคณะ พบว่ามี Nak^a negative 2.28%[11] และการศึกษาในจีนประมาณ 2%[12,16,17] จึงเป็นแอนติเจนที่มีความสำคัญทางคลินิกชนิดหนึ่ง ซึ่งควรทำการศึกษาในกลุ่มประชากรไทยให้ครอบคลุมมากขึ้น และศึกษาทางโมเลกุลของยีนต่อไป

สรุป

จากการศึกษานี้ได้ตรวจฟีโนไทป์ของแอนติเจน CD36 หรือ Nak^a ในผู้บริจาคเกล็ดโลหิตคนไทย พบว่าส่วนใหญ่เป็น CD36 positive โดย CD36 deficiency ที่พบได้น้อยสามารถจำแนกชนิดได้ 6 ราย ส่วนใหญ่เป็น CD36 deficiency type II และ CD36 deficiency type I พบได้น้อย ซึ่งอาจทำให้เกิดการ alloimmunization และเกิดปัญหาทางคลินิกได้ อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพยากรณ์ความเสี่ยงการเกิด alloimmunization ในประชากรไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เอกสารอ้างอิง

1. Reé ME, Safranow K, Ponoydjuss W. Molecular basis of human CD36 gene mutations. Mol Med. 2007;13:388-96.
2. Fujino H, Ohta K, Taniue J, Nagao N, Hino M, Yamane T, et al. Primary refractoriness to platelet transfusion caused by Nak(a) antibody alone. Vox Sang. 2001;81:42-4.
3. Taketani T, Ito K, Michihata S, Kanei R, Uchiyama A, Hitrata Y, et al. Neonatal isoimmune thrombocytopenia caused by type I CD36 deficiency having novel splicing isoforms of the CD36 gene. Eur J Haematol. 2008;81:70-4.
4. Kanklrawatana S, Kupatawintu P, Juji T, Veeralkul G, Ngernchara S, Chongkulwatana V, O'Charoen R. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-Nak(a). Transfusion. 2001;41 376-7.
5. Bierling P, Godeau B, Fromont P, Bettaieb A, Debili N, el-Kassar N, et al. Posttransfusion purpura-like syndrome associated with CD36 (Nak^a) isoimmunization. Transfusion. 1996;36:77-82.
6. Nakajima F, Nishimura M, Hashimoto S, Okazaki H, Tadokoro K. Role of anti-Nak^a antibody, monocyte and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury. Vox Sang. 2008;95:318-23.
7. Martin C, Chevrot M, Poirier H, Passilly-Degrace P, Niot I, Besnard P. CD36 as a lipid sensor. Physiol Behav. 2011;105:36-42.
8. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B. CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. Cell. 1989;58:95-101.
9. Tomiyama Y, Take H, Ikeda H, Mitani T, Furubayashi T, Mizutani H, et al. Identification of the platelet-specific alloantigen, Nak^a, on platelet membrane glycoprotein IV. Blood. 1990;76: 684-7.
10. Lee K, Godeau B, Fromont P, Plonquet A, Debili N, Bachir D, et al. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. Transfusion. 1999;39:873-9.
11. Curtis BR, Aster RH. Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians. Transfusion. 1996;36:331-4.
12. Xu X, Liu Y, Hong X, Chen S, Ma K, Lan X, et al. Variants of CD36 gene and their association with CD36 protein expression in platelets. Blood Transfus. 2014;12:657-64.
13. Urwijitaroon Y, Barusrux S, Romphruk A, Puapairoj C. Frequency of human platelet antigens among blood donors in northeastern Thailand. Transfusion. 1995;35:868-70.
14. Yamamoto N, Akamatsu N, Sakurabe H, Yamasaki H, Tanoue K. Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. Blood. 1994;83:392-7.
15. Li R, Qiao Z, Ling B, Lu P, Zhu Z. Incidence and molecular basis of CD36 deficiency in Shanghai population. Transfusion. 2015;55:666-73.
16. Curtis BR, Ali S, Glazier AM, Ebert DD, Aitman TJ, Aster RH. Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature. Transfusion. 2002;42:1173-9.
17. Xu X, Ye X, Xia W, Liu J, Ding H, Deng J, et al. Studies on CD36 deficiency in South China: Two cases demonstrating the clinical impact of anti-CD36 antibodies. Thromb Haemost. 2013;110:1199-206.

โครงการประชุมวิชาการระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 6
The 6th National and International Conference
"งานวิชาการรับใช้สังคม" Research to Serve Society
22 มิถุนายน 2561 / 22nd June 2018
ณ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ
at Huachiew Chalermprakiet University Samutprakarn, Thailand

การศึกษาเบื้องต้น Variant ของยีน CD36 ในส่วน Exon 2 - 7 ในผู้บริจาคโลหิต CD36 Deficiency จำนวน 5 ตัวอย่าง

Variant of CD36 Gene on Exon 2 - 7 in Five CD36 Deficiency Donors : Preliminary Study

มยุรี เก่งเกตุ[1*], สมหญิง งามอุรุเลิศ[1], ธนสาร ศิริรัตน์[1], อรรถพล ศรีสุดดี[2], ศศิประภา สว่างโลก[1], ณัฐวดี อุ่นจิตติชัย[1]

[1] คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

[2] ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

*Email : mayuree.ke@gmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) และหา Variant ของยีน CD36 ในส่วน Exon ที่ 2 ถึง 7 ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่เป็น CD36 Deficiency ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

วิธีการทดสอบ หาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR และวิเคราะห์หา variant ของยีน CD36 ในส่วนของ exon ที่ 2 ถึง 7 จากผล DNA Sequencing ของ CD36 deficiency type I จำนวน 1 ราย และ CD36 deficiency type II จำนวน 4 ราย

ผลการทดลอง สภาวะที่เหมาะสมวิธี PCR ของ exon 2 ถึง 5 คือ initial denaturation 96°C 5 นาที, denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 58°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที และ final extension 72°C 7 นาที ส่วน exon 6 ถึง 7 คือ annealing 55°C 45 วินาที ช่วงอื่นเหมือนโปรแกรมแรก พบว่ามี variant ที่น่าสนใจใน exon ที่ 5 คือ 332-333 delCA ในตัวอย่าง CD36 deficiency type I และ 287 G>C ในตัวอย่างที่เป็น CD36 deficiency type II

คำสำคัญ : CD36 deficiency variant PCR DNA sequencing

Abstract

Objective: The aim of this study was to optimize Polymerase Chain Reaction (PCR) condition and detect the variant of CD36 gene on exon 2-7 in CD36 deficiency donors of National Blood Center, Thai Red Cross Society.

Method: We examined optimal conditions for PCR technique and analyzed the variant of CD36 gene on exon 2-7 from CD36 deficiency type I (1 sample) and CD36 deficiency type II (4 samples) DNA sequencing.

Results: The optimal PCR condition for exon 2-5 was initial denaturation 96°C for 5 minutes, denaturation 96°C for 30 seconds, annealing 58°C for 45 seconds, extension 72°C for 30

seconds and final extension 72°C for 7minutes while the optimal condition for exon 6-7 was program which was similar to first program except annealing temperature was at 55°C for 45 seconds. Interestingly, we found variant in exon 5 which was 332-333 delCA in CD36 deficiency type I and 287 G>C in one of the CD36 deficiency type II.

Keywords : CD36 deficiency, variant, PCR, DNA sequencing

บทนำ

CD36 เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งอยู่บนผิวเซลล์หลายชนิดเช่น เกล็ดเลือด โมโนไซต์ erythrocytes differentiated adipocytes และ skeletal muscle เรียกได้หลายชนิดเช่น CD36 antigen, Nak^{a} antigen, Glycoprotein IV (GPIV), GPIIIb membrane protein, platelet collagen receptor (Greenwalt et al., 1990 & Ge et al., 2005) มีขนาด 88 kDa จัดอยู่ในกลุ่ม Scavenger receptor Type B family มีหน้าที่หลายอย่าง เช่นเป็น receptor ต่อโมเลกุลของ Type V Collagen ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเกล็ดเลือด และยังเป็น 1 ใน receptor ของ thrombospondin, oxidative modified low-density lipoprotein, long-chain fatty acids และการเข้าเซลล์ของเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* (Endemann et.al., 1993, Brouwers et.al., 2004, Cserti-Gazdewich et.at., 2008) CD36 จึงมีความสัมพันธ์กับหลายโรค มีรายงานการศึกษา CD36 มีความสัมพันธ์กับภาวะอ้วน และ ไขมันสูง เนื่องจาก CD36 มีหน้าที่กำจัด oxidized LDL จาก plasma ซึ่งทำให้เกี่ยวข้องกับโรค artherosclerosis, โรคเบาหวานชนิดที่สอง โรค Alzheimer และ เป็นต้น (Collot-Teixeira et.at., 2007), ยีน CD36 อยู่บนโครโมโซมที่ 7 q11.2 มีจำนวน 15 exon มีส่วนที่สามารถแปลรหัสไปสร้าง CD36 protein ได้ อยู่ใน exon 3, exon 4-13 และอยู่ในบางส่วนของ exon 14 (Fernandaz-Ruiz et.al., 1993 & Rac et.al., 2004) การเกิด mutation หรือมี variant ของยีน CD36 ทำให้เกิด CD36 deficiency (Nak^{a} negative) คือ การขาดหายไปของ CD36 antigen ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนเมื่อถูกกระตุ้น เช่นจากการรับเลือดหรือจากการตั้งครรภ์ และรับ CD36 antigen เข้าในร่างกาย ทำให้สร้างแอนติบอดีขึ้นและก่อให้เกิดอาการทางคลินิก เช่น transfusion-related acute lung injury (TRALI), fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT), platelet transfusion refractoriness (PTR), Post transfusion purpura (PTP) (Tomiyama et.al., 1990, Yamamoto et.al., 1990 & Xu et.al., 2013) CD36 deficiency สามารถแยกประเภทออกเป็น 2 ชนิด คือ Type I CD36 deficiency ไม่พบการแสดงออกของ CD36 บนเกล็ดเลือด และโมโนไซต์ มีความเสี่ยงที่จะสร้าง anti-CD36 หลังการได้รับเลือดหรืออยู่ในระหว่างการตั้งครรภ์ ส่วน Type II CD36 deficiency ไม่พบการแสดงออกของ CD36 เฉพาะบนเกล็ดเลือด (Yamamoto et.al., 1990)

CD36 deficiency พบได้ในประชากร African 4-8%, ในประชากรญี่ปุ่น 3-4%, ในประชากร African American ประมาณ 2.4%, แต่พบได้ค่อนข้างน้อยในชาว Caucasians 0.3% (Tomiyama et.al., 1990 & Lee et.al., 1999) และพบประมาณ 2% ในประชากรจีน (Xu et.al., 2014 & Li et.al., 2014) เคยมีรายงานความถี่ของ CD36 deficiency phenotype ของประชากรไทย ได้แก่ Urwijitaroon Y และคณะ พบ CD36 deficiency 2.28% (Urwijitaroon et.al., 1995) และงานวิจัยของมยุรี เก่งเกตุ และคณะ พบความถี่ CD36 deficiency ของผู้บริจาค

โลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เท่ากับ 1.67% (มยุรี เก่งเกตุ และคณะ, 2017) ในการศึกษา variant ของยีน CD36 ในชาวไทยยังมีน้อยมาก Kazuya Omi และคณะได้รายงาน polymorphism ของยีน CD36 ในผู้ป่วยไทยที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *Plasmodium falciparum* พบว่า ผู้ที่เป็น cerebral malaria 3% เป็น CD36 deficiency จากสาเหตุที่มีการขาดหายไปของเบสสองเบสบน exon 5 ของยีน ตำแหน่ง 539-540 (539delAC) (Omi et.al., 2002) ซึ่งปัจจุบันได้เปลี่ยนเป็น 329-330 delAC ซึ่งเป็น variant ที่พบได้บ่อยในประชากรแถบเอเชีย (Xu et.al., 2014) Masuda และคณะ ได้ศึกษา variant ของยีน CD36 ในชาวญี่ปุ่นที่มีสุขภาพดี พบว่า ส่วนใหญ่มี variant ของยีนคือ C268T (8.9 %) พบว่าเป็นสาเหตุให้เกิดทั้ง CD36 deficiency type I และ type II (Masuda et.al., 2015) Li และคณะ ศึกษาด้านโมเลกุลและความถี่ของ CD36 Deficiency ใน ผู้บริจาคโลหิตชาวเซี่ยงไฮ้ ที่มีสุขภาพดี 1,022 คน พบว่ามี 20 คน (2.0%) เป็น CD36 Deficiency Type II และมี 2 (0.2 %) เป็น CD36 Deficiency Type I เมื่อวิเคราะห์ variant ของยีนจากผล DNA sequencing พบว่ามี variant ทั้งหมด 15 แบบ โดยvariant ที่พบมากที่สุด คือ 329-330delAC และ 1228-1239delATTGTGCCTATT (Li et.al., 2014) นอกจากนั้น Xu และคณะ ได้ศึกษา variant ของยีน CD36 ในประชากรชาวจีนฮั่นที่มีสุขภาพดีจำนวน 477 ราย ด้วยวิธี polymerase chain reaction sequence-based typing (PCR-SBT) พบว่ามี CD36 deficiency (3.6%) โดยเป็นชนิด CD36 deficiency type II ทั้งหมด และพบ Variant 20 แบบ ที่พบมากสุดในชาวฮั่น คือ 329-332 delAC และ 1228-1239 del12bp ที่เป็น variant ใหม่ พบ 5 แบบ (111 A>T,681 C>A, 1172-1183 del12b, 1236 delT and 1395 A>C) และพบ 2 variant ใน exon2-3 ส่วนที่ไม่มีการแปลรหัส (5'-UTR) ได้แก่ nt-132 A>C (rs1049654) ใน exon 2 และ nt-18 insA (rs75112981) ใน exon 3 ซึ่งอาจเป็นสาเหตุการเกิด CD36 deficiency type II (Xu et.al., 2014)

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาหา variant ของยีน CD36 ในส่วน exon ที่ 2-7 ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่เป็น CD36 deficiency ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CD36 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และวิเคราะห์ผล DNA sequencing หา variant ของยีน CD36 ในส่วนของ exon ที่ 2-7 เพื่อนำข้อมูลมาพัฒนาการตรวจหาผู้บริจาคที่เป็น CD36 deficiency ด้วยเทคนิค PCR-SSP ต่อไป

วิธีการวิจัย

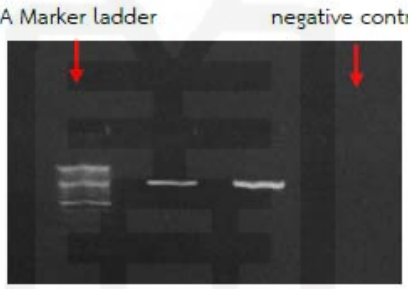
ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Samples)

DNA ของผู้บริจาคเกล็ดเลือด ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่มีผล CD36 antigen จากวิธี flow cytometry ที่ให้ผล Positive จำนวน 2 ราย และผู้บริจาคที่มีผล CD36 antigen ให้ผล Negative จำนวน 5 ราย จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (มยุรี เก่งเกตุ และคณะ, 2017) โดยการศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมงานวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย หมายเลข 3/2558

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CD36 ในส่วนของ exon ที่ 2-7

เตรียมส่วนผสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวมทั้งหมด 10 □L ประกอบด้วย Gotaq® Green Master Mix (Promega/USA) 5 □L, forward primer (ความเข้มข้น 6.4 □M) 1 □L, reverse primer (ความเข้มข้น 6.4 □M) 1 □L, PCR grade DW 1 □L และเติม DNA sample 2 □L แล้วนำส่วนผสมที่ได้มาทำในขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR โดยโปรแกรมแรกที่หาสภาวะที่เหมาะสมไว้ CD36P1 คือ initial denaturation 96°C 5 นาที 1 รอบ, denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 58°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที ทั้งหมด 35 รอบ และ final extension 72°C 7 นาที 1 รอบ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ ไปแยกด้วยเครื่อง gel electrophoresis โดยใช้ 2-3% agarose gel ที่มี ethidium bromide ผสมอยู่ นำไปดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator รายละเอียด primers ดังแสดงในตารางที่ 1

การอ่านผล การอ่านผลการตรวจโดยวิธี PCR พิจารณาความน่าเชื่อถือและความถูกต้องของการทดลองจากการปรากฏของแถบ DNA Marker leader ในหลอดที่ใช้ Distilled water (DW) เป็นตัวควบคุมผลลบ (negative control) จะต้องไม่ปรากฏแถบใดๆ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการอ่านผลโดยวิธี PCR

การแปลผล

ภายหลังขั้นตอน PCR หากปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น โดยมีขนาด Amplicon size ตรงตามกำหนด แสดงว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่ละ Exon สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อส่ง ตรวจ DNA sequencing ที่บริษัท Macrogen (South Korea) เพื่อหา variant ของ CD36 deficiency

อ่านผล และแปลผล DNA sequencing

หา variant ของผู้บริจาคโลหิตที่เป็น CD36 deficiency ในส่วนของ exon 2-7 โดยใช้โปรแกรม CodonCode aligner version 8.0.1 (CodonCode Coperation, MA, USA) เพื่อหาลำดับเบสที่มี variant โดยเปรียบเทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูล https://www.ncbi.nlm.nih.gov โดยลำดับเบสแสดงในตารางที่ 1

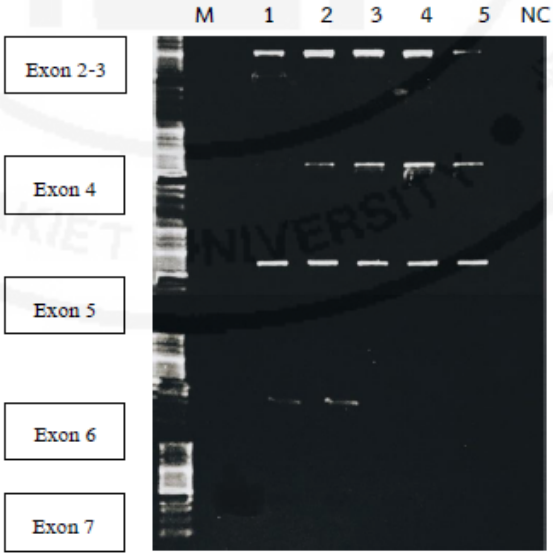
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล primer ในแต่ละ Exon

CD36 gene	Nucleotide sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
Exon 2, exon 3	E23F: ATGGTGATATTAGAGAGTGT E23R: TTTAAGACAGCAATGGAGTC	1,070
Exon 4	E4F: GTAAAAGGCTAAAAAGACTG E4R: ACTTCATAAACATAGGGAAG	672
Exon 5	E5F: CCCCTTCTCGTTAGTTTGCT E5R: TTTCTTACAGGCTGCGTTTG	707
Exon 6	E6F: TTGTATTAAGCTCAATATTAGC E6R: ATAAAATTATGCCTTGCC	350
exon 7	E7F: AAGTAACATTTTCCCATAC E7R: ATGAATACTATTCCTGCT	187

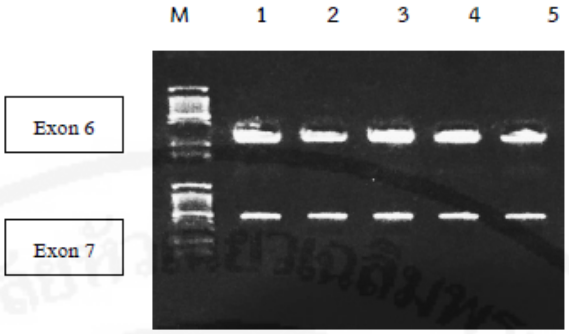
ผลการศึกษา

ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหายีน CD36 ใน Exon ที่ 2-7 โดยวิธี PCR

ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ Exon ที่ 2-7 ของ CD36 โดยวิธีพีซีอาร์ โปรแกรมแรกที่ใช้ CD36P1 initial denaturation 96°C 5 นาที, denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 58°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที และ final extension 72°C 7 นาที ทั้งหมด 35 รอบ พบว่า Exon 2 – 5 มีแถบดีเอ็นขึ้น แต่ Exon 6 – 7 ไม่มีแถบดีเอ็นเอขึ้น ดังรูปที่ 2 จึงปรับสภาวะจนเหมาะสมดังรูปที่ 3 ดังรายละเอียดในตารางที่ 2



รูปที่ 2 แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 2-7 Program CD36P1



รูปที่ 3 แสดงผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของ Exon 6 และ 7 Program CD36P8

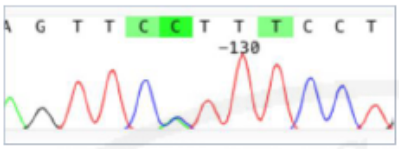
ตารางที่ 2 โปรแกรมที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR สำหรับ Exon 2-7 ยีน CD36

Exon	Program name	PCR
Exon 2-3	CD35P1	- Initial denaturation 96°C 5 นาที - denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 58°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที (ทั้งหมด 35 รอบ) - final extension 72°C 7 นาที
Exon 4		
Exon 5		
Exon 6	CD35P8	- Initial denaturation 96°C 5 นาที - denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 55°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที (ทั้งหมด 35 รอบ) - final extension 72°C 7 นาที
Exon 7		

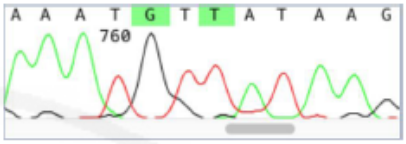
ผลการวิเคราะห์ DNA sequencing

การตรวจวิเคราะห์ผล DNA sequencing ของ exon ที่ 2-7 จากตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่มีภาวะ CD36 deficiency จำนวน 5 ราย ด้วยโปรแกรม CodonCode aligner พบ variant ทั้งหมด 8 แบบ ซึ่งอยู่ในส่วน coding region 3 แบบ และส่วน non-coding region ก่อนหรือหลังส่วน coding region 5 แบบ ดังแสดงในตารางที่ 3 และแสดงรูปภาพ histogram ของตำแหน่ง variant ที่พบในรูปที่ 4

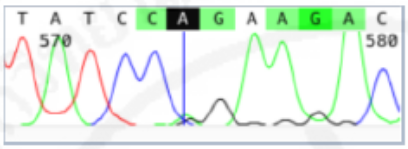
A) C.80646139A_C (c.-132A>C)



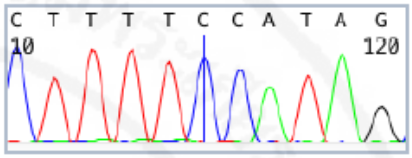
B) C.80647015C>T (c.120+155C>T)



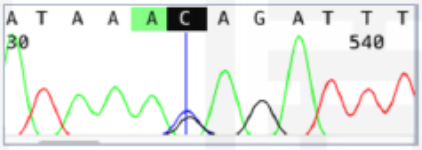
C) C.80646844A_G (c.104A>G)



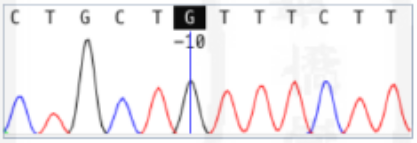
D) c.80656534T>C (c.121-6T>C)



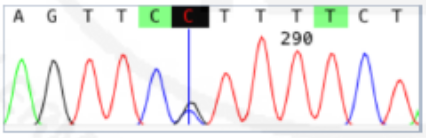
E) c.80656954C>G (c.281+254 C>G)



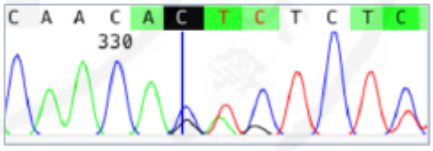
F) c.80661053A>G (c.282-10 A>G)



G) c.80661068G>C (c.287G>C)



H) c.80661113_80661114delCA (c.332_333delCA)



รูปที่ 4 ภาพ histogram ของตำแหน่ง variant ของ exon 2-3 (A-C), Exon 4 (D-E), Exon 5 (F-H)

ตารางที่ 3 variant ที่ตรวจพบใน exon 2-7 และส่วน non-coding

* Pathogenic variant (Platelet glycoprotein IV deficiency)

Location	mRNA	Amino acid	Variant	Change in amino acid	Variant sample	dbSNP number
Exon 2-3	-183 to +120	1-40	c.80646139A>C	c.-132A>C: 5 prime UTR variant	No. 1,5 (A/C) No. 4, (C/C)	rs1049654 A/C
			c.80647015C>T	c.120+155C>T	No.1	rs1527463 C/T
			c.80646844A>G	c.104A>G	No.1	
Exon 4	121-281	41-94	c.80656534T>C	c.121-6T>C	No.1,3,5 (T/C) No. 2 (C/C)	rs3173798 C/T
			c.80656954C>G	c.281+254 C>G	No.1,2,3,5	rs3212165C/G
Exon 5	282-429	94-143	c.80661053A>G	c.282-10 A>G	No.1-5 (G/G)	rs3211892A/G
			c.80661068G>C	c.287G>C, Arg96Pro	No.2 (G/C)	rs70961715 A/C/G
			c.80661113_80661114 delCA	c.332_333delCA, Thr111Sers	No.4 (-/CA)	rs1085307059 -/CA *
Exon 6	430-609	144-203	-	-	-	-
Exon 7	610-701	204-234	-	-	-	-

อภิปราย และสรุปผลการวิจัย

จากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CD36 โดยวิธี PCR และทำการวิเคราะห์หา variant ของยีน CD36 ในส่วน exon 2-7 จากผลที่ได้จาก DNA sequencing ตัวอย่าง DNA ของผู้บริจาคโลหิตที่เป็น CD36 deficiency ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติสภากาชาดไทย จำนวน 5 ราย โดย 1 ราย (No.4) เป็น CD36 deficiency type I และอีก 4 รายเป็น CD36 deficiency type II จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CD36 ใน exon 2-7 โดยวิธี PCR พบว่า exon 2-5 สภาวะที่เหมาะสมคือ โปรแกรม CD36P1 ดังนี้ initial denaturation 96°C 5 นาที 1 รอบ denaturation 96°C 30 วินาที, annealing 58°C 45 วินาที, extension 72°C 30 วินาที ทั้งหมด 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย final extension 72°C 7 นาที ในส่วนของ exon 6-7 มีสภาวะที่เหมาะสมคือ โปรแกรม CD36P8 โดยมีขั้นตอนต่างๆ เหมือนโปรแกรม CD36P1 ยกเว้นขั้นตอน annealing เปลี่ยนเป็น 55°C 45 วินาที

การวิเคราะห์ variant จากผล DNA sequencing โดยใช้โปรแกรม Codon-Code aligner พบ variant ใน exon 2-5 แต่ไม่พบ variant ใน exon 6 และ 7 ซึ่งแบ่งได้เป็น variant ที่เคยมีรายงานความสำคัญทางคลินิก ได้แก่ 332-333delCA ซึ่งอยู่บน exon 5 ทำให้มีการเลื่อนของกรดอะมิโน threonine และ serine เกิด frameshift mutation ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 111 (Thr111Ser) พบในตัวอย่าง DNA ที่เป็น type I CD36 deficiency (no.4) และ variant 287 G>C ในตัวอย่าง DNA ที่เป็น type II CD36 deficiency (no.2) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสบนยีนบน exon 5 เปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนจาก arginine เป็น leucine ที่ลำดับกรดอะมิโนที่ 96 (Arg96Pro) ซึ่งอาจทำให้มีผลต่อ phenotype ที่แสดงออกมา นอกจากนั้นยังพบว่า variant อื่นๆ ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนก่อนหรือหลัง coding region ได้แก่ c.-132A>C: 5 prime UTR, c.120+155C>T, c.121-6T>C, c.281+254 C>G, และ c.282-10 A>G ทั้งนี้ยังพบว่ามี variant ที่พบในทุกตัวอย่าง คือ c.282-10 A>G (rs3211892 A/G)

จากผลการศึกษา variant ในส่วน coding region ที่พบ 287G>C ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบน CD36 สอดคล้องกับการศึกษาของ Kazuya Omi ที่ศึกษาในคนไทยที่ติดเชื้อมาลาเรีย และงานวิจัยของ Xu และคณะ ที่ศึกษาในชาวจีนฮั่น (Xu et.al., 2014, Li et.al., 2014, Tomiyama et.al., 1990 & Omi et.al., 2002) ส่วน variant แบบ 332-333delCA ไม่พบความสอดคล้องกับงานวิจัยที่กล่าวมา นอกจากนั้นในการศึกษานี้พบ variant ในส่วน non-coding region หลายตำแหน่ง ที่น่าสนใจได้แก่ nt-132 A>C ใน exon2 ซึ่งอยู่ในส่วน 5 prime UTR อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างโปรตีน CD36 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอาจทำให้การสร้างโปรตีนผิดไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Xu และคณะ เช่นกัน (Xu et.al., 2014) การค้นพบ variant ในส่วน intron ของยีน CD36 ในตำแหน่งอื่นๆ จะช่วยในการอธิบายกลไกการแสดงออกของ CD36 ได้อย่างไร จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป variant ในส่วน non coding region ที่พบในทุกตัวอย่าง คือ c.282-10 A>G แต่เนื่องจากไม่ได้ศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง ที่มี CD36 จึงยังไม่สามารถทำการสรุปได้ว่า variant นี้จะมีความสัมพันธ์กับการเกิด CD36 deficiency หรือไม่ จึงควรนำงานวิจัยนี้ไปทำการศึกษาเพิ่มเติมในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น และทำการศึกษาให้ครอบคลุมในยีน CD36 ทั้งหมด เพื่อเป็นข้อมูลของประชากรไทยต่อไป และเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจ variant ที่มีความง่ายและสะดวกมากขึ้น และราคาถูก เช่นวิธี PCR-SSP เนื่องจากการตรวจด้วยเทคนิค DNA sequencing ต้องใช้เวลาและเครื่องมือราคาแพง จึงใช้งบประมาณในการตรวจวิเคราะห์มาก อาจไม่เหมาะสมกับการใช้งานประจำ

เอกสารอ้างอิง

มยุรี เก่งเกตุ, อรรถพล ศรีสุดดี, ชาย ฤกษ์ชัย, กนกวรรณ ชินบดี, ภาวิณี คุปตวินทุ, ศิริลักษณ์ เพียรเจริญ และคณะ. (2017). การศึกษาชนิด CD36 (Naka antigen) ในตัวอย่างผู้บริจาคเกล็ดเลือดของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย. *วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต, 27(2)*, 111-116.

Armesilla, A.L. & Vega, M.A. (1994). Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry, 269*, 18985-18991.

Barnwell J.W., Asch A.S., & Nachman R.L. (1989). A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for cytoadherance ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation, 84*, 765-772.

Brouwers, A., Langlois, M., Delanghe, J., Billiet, J., De Buyzere, M., Vercaemst, R., et al. (2004). Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and heptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis, 176*, 189-195.

Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., McGregor, J.L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular Research, 75*, 468-477.

Cserti-Gazdewich, C.M., Dzik, W.H., Dorn, M.E., Quagliaroli, R.O., Xu, S., Ssewanyana, I., et al. (2008). Quantitation of CD36(Platelet glycoprotein IV) expression on platelets and monocytes by flow cytometry: Application to the study of Plasmodium falciparum malaria. *Cytometry Part B Clinical Cytometry, 76*, 127-134.

Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant C.M., White R.T., & Protter A.A. (1993). CD 36 is a receptor for oxidized low-density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry, 268*, 11811-11816.

Fernandaz-Ruiz, E, Armesilla, A.L., Sanchez, M.F. & Vega M.A. (1993) Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome 7q11.2. *Genomics, 17*, 759-761.

Ge, Y. & Elghetany, M.T. (2005). CD36: a nultiligand molecule. Lab Hematol, 11, 31-37.

Greenwalt, D.E., Watt, K.W., So, O.Y. & Jiwani, N. (1990). PAS IV an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV). *Biochemistry, 29*, 7054-7059.

Lee, K., Godeau, B., Fromont, P., Plonquet, A., Debili, N., Bachir, D., et al. (1999). CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion. 39(8)*, 873-879.

Li, R., Qiao, Z., Ling, B., Lu, P. & Zhu, Z. (2014). Incidence and molecular basis of CD36 deficiency in Shanghai population. *Transfusion, 55(3)*, 666–673.

Masuda, Y., Tamura, S., Matsuno, K., Nagasawa, A., Hayasaka, K., Shimizu, C., et al. (2015). Diverse CD36 expression among Japanese population : defective CD36 mutations cause platelet and monocyte CD36 reductions in not only deficient but also normal phenotype subjects. *Thrombosis Research, 135(5)*, 951–957.

Omi, K., Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Looareesuwan, S., et al. (2002). Polymorphisms of CD36 in Thai malaria patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 33(3)*, 1-4.

Rać, M.E., Safranow, K., Poncyljusz, W., Monika, E.R., Krzysztof, S. & Wojciech, P. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Molecular Medicine, 13*, 288-296.

Tomiyama, Y., Take, H., Ikeda, H., Mitani, T., Furubayashi, T., Mizutani, H., et al. (1990). Identification of the platelet-specific alloantigen, Naka, on platelet membrane glycoprotein IV. *Blood, 76*, 684-687.

Urwijitaroon Y., Barusrux S., Romphruk A. & Puapairoj C. (1995). Frequency of human platelet antigens among blood donors in northeastern Thailand. Transfusion, 35(10), 868-870.

Xu, X., Liu, Y., Hong, X., Chen, S., Ma, K., Lan, X., et al. (2014). Variants of CD36 gene and their association with CD36 protein expression in platelets. *Blood Transfusion, 12*, 557-564.

Xu, X., Ye, X., Xia, W., Liu, J., Ding, H., Deng, J., et al. (2013). Studies on CD36 deficiency in South China:Two case demonstrating the clinical impact of anti-CD36 antibodies. *Thrombosis and Haemostasis, 110*, 1199-1206.

ภาคผนวก ค
เอกสารรับรองจริยธรรมงานวิจัย

COA No. NBC 3/2015

The Thai Red Cross Society

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ :	การศึกษา Variant CD36 ในผู้บริจาคโลหิตไทยของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ
รหัสโครงการ:	3/2558
หัวหน้าโครงการ :	ดร. มยุรี เก่งเกตุ
หน่วยงานที่สังกัด :	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
สถานที่ทำการวิจัย :	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
เอกสารที่รับรอง :	โครงการวิจัย
วันที่รับรอง :	21 สิงหาคม 2558
วันหมดอายุ :	21 สิงหาคม 2559

คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ขอรับรองโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษา Variant CD36 ในผู้บริจาคโลหิตไทยของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ"

ลงนาม ..... 21 สิงหาคม 2558

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงศศิธร เพชรจันทร)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ

ลงนาม ..... 21 สิงหาคม 2558

(แพทย์หญิงสร้อยสอางค์ พิกุลสด)

ผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ภาคผนวก ง
ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ – สกุล	นางมยุรี เก่งเกตุ
ประวัติการศึกษา	วท.บ.เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
	ปร.ด. พยาธิวิทยาคลินิก มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
โทรศัพท์	02 3126300 ต่อ 1250

ผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นางสาวภาวิณี คุปตวินทุ
ประวัติการศึกษา	วท.บ.เทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	วท.ม.เทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย
โทรศัพท์	02 2639600