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 & Rać 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)

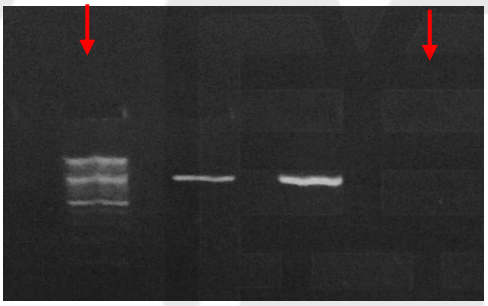
DNA ของผู้บริจาคเกล็ดเลือด ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ที่มีผล CD36 antigen จากวิธี flow cytometry ที่ให้ผล Positive จำนวน 2 ราย และผู้บริจาคที่มีผล CD36 antigen ให้ผล Negative จำนวน 5 ราย จากการศึกษาก่อนหน้านี้ (มยุรี เก่งเกตุ และคณะ, 2017) โดยการศึกษาวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมงานวิจัย จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย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

DNA Marker ladder negative control (DW)



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

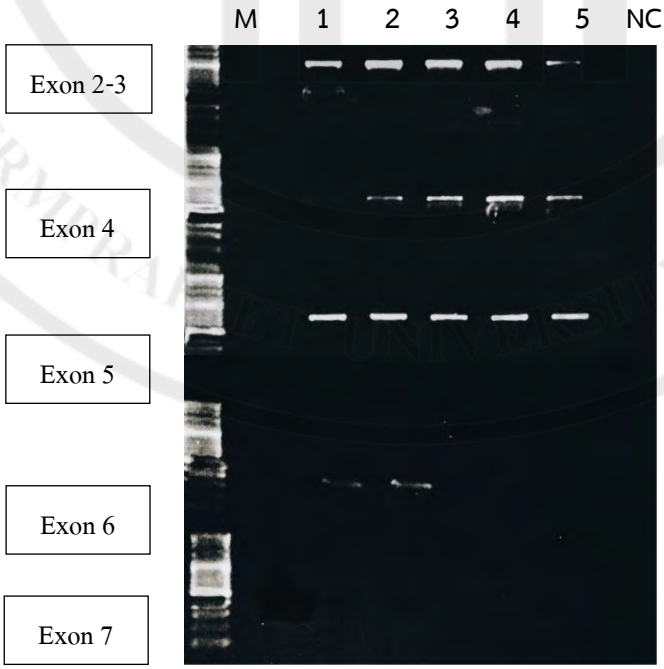
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูล primer ในแต่ละ Exon

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

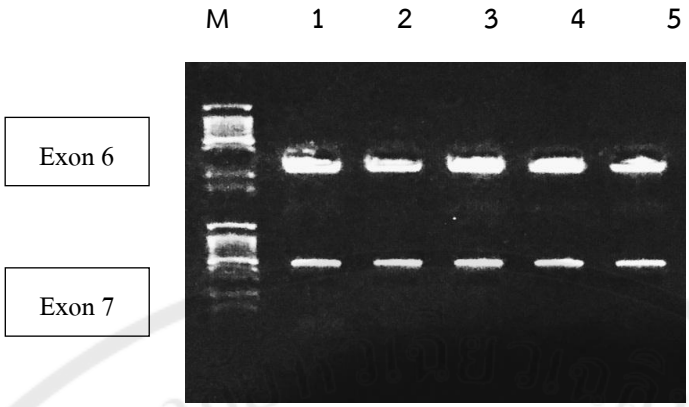
ผลการศึกษา

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		

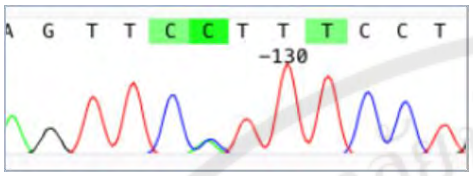
ผลการวิเคราะห์ DNA sequencing

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

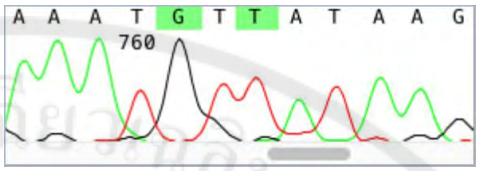
ตารางที่ 3 variant ที่ตรวจพบใน exon 2-7 และส่วน non-coding

* Pathogenic variant (Platelet glycoprotein IV deficiency)

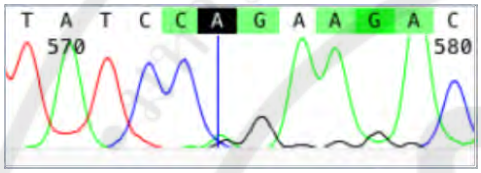
A) C.80646139A_C (c.-132A>C)



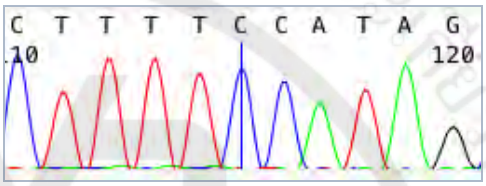
B) C.80647015C>T (c.120+155C>T)



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



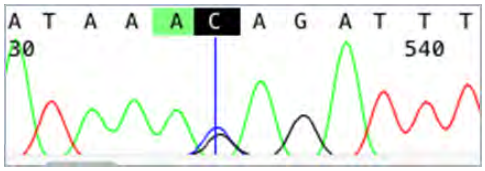
D) c.80656534T>C (c.121-6T>C)

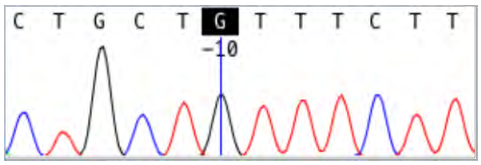


E) c.80656954C>G (c.281+254 C>G)

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

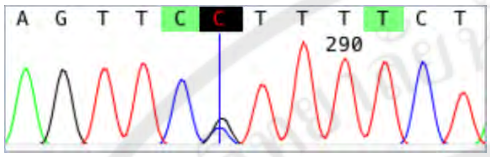
Location	mRNA	Amino acid	Variant	Change in amino acid	Variant sample	dbSNP number
Exon 2-3	-183 to +120	1-40	c.80646139A>C	c.-132A>C: 5 prime UTR variant	No. 1,5 (A/C) No. 4, (C/C)	rs1049654 A/C
			c.80647015C>T	c.120+155C>T	No.1	rs1527463 C/T
			c.80646844A>G	c.104A>G	No.1	
Exon 4	121-281	41-94	c.80656534T>C	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	-	-	-	-

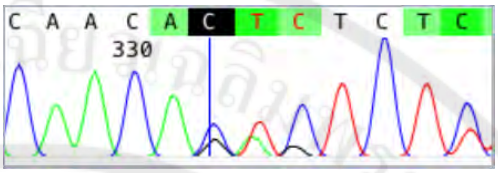




G) c.80661068G>C (c.287G>C)

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)

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., lkeda, 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.

Yamamoto, N., Ikeda, H., Tandon, N.N., Herman, J., Tomiyama, Y., Mitani, T, et al. (1990). A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donor: Naka platelets lack detectable GPIV (CD36). *Blood, 76*, 1698-1703.

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ • 華僑崇聖大學 • HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY •