



การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล CD36 บนเกล็ดเลือด ในผู้ป่วยโรคโลหิตจางชาวไทยด้วยวิธีโฟลไซโตเมทรี

รุ่งอรุณ พวงธรรม¹, ยุภาภรณ์ สุทวีชัย², ชาญวิทย์ ลีลาญวัฒน์^{3,4}, อมรรัตน์ ร่มพฤษชัย^{2,4*}

Received: February 16, 2018

Revised: May 17, 2018

Accepted: June 6, 2018

บทคัดย่อ

CD36 เป็นโมเลกุลที่พบบนผิวเซลล์หลายชนิด ได้แก่ เมกาคาริโอไซต์ เกล็ดเลือด โมโนไซต์ เซลล์ตัวอ่อน เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด และเซลล์ไขมัน CD36 ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ของโมเลกุลต่าง ๆ และมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes) ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่ได้รับส่วนประกอบเลือดที่มีแอนติบอดีต่อ CD36 สามารถทำให้เกิดภาวะ immune-mediated thrombocytopenia และภาวะ transfusion related acute lung injury (TRALI) ได้ การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและตรวจหา CD36 deficiency ในกลุ่มผู้ป่วยโรคโลหิตจางชาวไทยที่อยู่อาศัยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 200 ราย ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี ผลการศึกษาพบว่าร้อยละ 97.5 (195/200 ราย) โดยมีค่า median fluorescent intensity (MFI) อยู่ระหว่าง 4.41 ถึง 44.90 และมีค่า mean \pm SD ของค่า MFI เท่ากับ 16.27 ± 8.44 พบลักษณะ CD36 type 2 deficiency (ไม่พบ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดแต่พบบนโมโนไซต์) จำนวน 5/200 ราย (2.5%) โดยในกลุ่มประชากรนี้ไม่พบลักษณะ CD36 type 1 deficiency (ไม่พบ CD36 ทั้งบนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์) การศึกษานี้ได้แสดงข้อมูลระดับการแสดงออกของโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือดในชาวไทยซึ่งมีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นควรมีการศึกษาการแสดงออกของยีน CD36 รวมทั้งการศึกษาทางด้านเอพิเจเนติก (epigenetic) เพิ่มเติมต่อไป การศึกษานี้เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ซึ่งอาจจะสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องได้

คำสำคัญ: CD36 expression, CD36 deficiency

¹ นักศึกษาหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ กลุ่มวิชานิติเวชศาสตร์ วิทยาลัยการบริการโลหิต คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* ผู้รับผิดชอบบทความ



The study of CD36 expression on platelets in Thai blood donors using flow cytometry

Roongaroon Phuangtham¹, Yupaporn Sudwilai², Chanvit Leelayuwat^{3, 4}, Amornrat V Romphruk^{2, 4*}

Abstract

CD36 is expressed on the surface of various human cells, including megakaryocyte, platelets, monocytes, erythroblasts, endothelial cells and adipocytes. CD36 is clinically important with several disorders, such as type 2 diabetes and atherosclerosis. Antibody against CD36 can be the cause of immune-mediated thrombocytopenia and transfusion related acute lung injury (TRALI). The aim of this study was to determine the CD36 expression on platelets and the frequency of CD36 deficiency in 200 Thais who live in the north-eastern part of Thailand by using flow cytometry. In this study, 195/200 subjects (97.5%) had CD36 expressed on platelets. The median fluorescent intensities (MFI) in this group were ranged from 4.41 to 44.90 and mean \pm SD of MFI was 16.27 ± 8.44 . CD36 type 2 deficiency (lacking CD36 expression on platelets) was 5/200 subjects (2.5%) and none of CD36 type 1 deficiency (lacking CD36 expression both on platelets and monocytes). In conclusion, the level of CD36 expression in this group showed high variability. Thus, the evaluation of gene expression level and epigenetic studies of CD36 in the population await further investigations. Finally, this study provide the baseline information of CD36 on platelets and monocytes which may be applied with associated diseases.

Keywords: CD36 expression, CD36 deficiency

¹ Doctor of Philosophy student in Biomedical Sciences Program, Faculty of Graduate School, Khon Kaen University

² Blood Transfusion Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

³ Department of Clinical Immunology and Transfusion Sciences, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

⁴ Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

* Corresponding author: (e-mail: aromphruk@gmail.com)

บทนำ

CD36 (Nak(a), GPIV, SR-BI, PAS-4) เป็น transmembrane glycoprotein ในกลุ่ม class B scavenger receptor family พบได้บนผิวเซลล์หลายชนิด ได้แก่ ผิวของเมกาคาริโอไซต์ เกล็ดเลือด โมโนไซต์ แมคโครฟาจ เซลล์ตัวอ่อนเม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อปมั่งหลอดเลือด และเซลล์ไขมัน^(1,2) CD36 ทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptor) ของโมเลกุลหลากหลายชนิด เช่น ทำหน้าที่เป็นตัวรับของ oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) จากรายงานวิจัยพบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีโมเลกุล CD36 มากบนผิวเซลล์แมคโครฟาจ เซลล์แมคโครฟาจจะสามารถนำโมเลกุล oxLDL เข้าสู่เซลล์ได้มาก และส่งผลให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ได้ในที่สุด ในทางตรงกันข้าม กลุ่มตัวอย่างที่ไม่พบการแสดงออกของโมเลกุล CD36 บนผิวเซลล์แมคโครฟาจ พบว่ามีโอกาสเสี่ยงในการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้น้อย⁽³⁾ มีงานวิจัยที่แสดงผลให้เห็นว่าปริมาณ CD36 ในพลาสมา (soluble CD36) ที่มากจะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes)⁽⁴⁾ นอกจากนี้ CD36 ยังมีความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการติดเชื้อมาลาเรีย โดย CD36 บนเซลล์เยื่อหลอดเลือดสามารถจับกับโปรตีน *P. falciparum* erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP1) ซึ่งพบได้บนผิวเม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียชนิด *P. falciparum* กลไกดังกล่าวส่งผลให้เม็ดเลือดแดงที่ติดเชื้อมาลาเรียเกาะติดอยู่บริเวณเซลล์เยื่อหลอดเลือด ทำให้เชื้อมาลาเรียสามารถเติบโตและหลบหลีกการทำลายจากเซลล์แมคโครฟาจที่เข้ามาได้⁽⁵⁾

การแสดงออกของ CD36 บนผิวเซลล์ในมนุษย์สามารถแบ่งเป็น 3 ประเภทหลัก ๆ ดังนี้ 1) CD36 expression คือตรวจพบโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ 2) CD36 type I deficiency คือตรวจไม่พบโมเลกุล CD36 ทั้งบนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ และ 3) CD36 type II deficiency คือตรวจไม่พบโมเลกุล CD36 บนผิวของเกล็ดเลือดแต่ตรวจพบบนผิวโมโนไซต์⁽⁶⁾ ในผู้ป่วยที่มีลักษณะ CD36 type I deficiency หากได้รับเกล็ดเลือดที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CD36 บนผิวเซลล์ ร่างกายจะถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อ CD36 หรือในด้าน

เวชศาสตร์บริการโลหิตมักเรียกว่าแอนติบอดีต่อ Nak(a) ซึ่งแอนติบอดีดังกล่าวเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ immune-mediated thrombocytopenia ได้แก่ 1) ภาวะไม่ตอบสนองต่อการให้เกล็ดเลือด (platelet transfusion refractoriness; PTR) 2) ภาวะเกล็ดเลือดต่ำในทารกในครรภ์และแรกคลอด (fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia; FNAIT) 3) ภาวะพบจุดเลือดออกหลังจากได้รับเลือด (post transfusion purpura; PTP)⁽⁷⁻⁹⁾ และหากให้พลาสมาที่มีแอนติบอดีต่อ CD36 แก่ผู้ป่วย จะสามารถทำให้เกิดภาวะ transfusion related acute lung injury (TRALI) ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต⁽¹⁰⁾ ภาวะที่พบได้อยู่เสมอในเวชปฏิบัติคือ PTR มีการศึกษาพบว่าประมาณร้อยละ 30 ของผู้ป่วยที่ได้รับเกล็ดเลือดหลายครั้งจะเกิดภาวะดังกล่าว^(11,12) จากรายงานการศึกษาอัตราการเกิดภาวะ FNAIT ในเด็กทารกบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีความชุกเท่ากับ 1:11,529 หรือร้อยละ 0.009 ของทารกแรกคลอด⁽¹³⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานอุบัติการณ์ในผู้ป่วยที่เกิดผลข้างเคียงในการให้เลือดต่อ 1 ยูนิต พบโอกาสเกิดภาวะ PTP เท่ากับ 1:143,000 และโอกาสเกิดภาวะ TRALI เท่ากับ 1:500⁽¹⁴⁾

ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ CD36 ประกอบด้วย exon 1 ถึง 15 อยู่บนตำแหน่งโครโมโซมคู่ที่ 7 (7q11.2) ขนาดประมาณ 88 kDa มีลักษณะหลากหลาย (high polymorphic) พบรายงานการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เบสในยีน CD36 ที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคไว้มากมาย ตัวอย่างเช่น ในกลุ่มคนที่มีภาวะ coronary atherosclerosis มักจะตรวจพบ single nucleotide polymorphism (SNP) ในยีน CD36 (rs1761667)⁽¹⁷⁾ หรือในผู้ป่วยที่มีลักษณะ CD36 type I deficiency ที่ตรวจพบมิวเทชันในยีน CD36 จะมีความรุนแรงในการติดเชื้อมาลาเรียน้อยกว่าในกลุ่มที่มีโมเลกุล CD36 แสดงออกบนผิวเซลล์⁽¹⁵⁾ แต่อย่างไรก็ตามในตัวอย่างบางรายที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์เบสในยีน CD36 กลับไม่พบลักษณะทางฟีโนไทป์เป็น CD36 deficiency⁽¹⁶⁾ ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาใดที่ทราบยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ CD36 บนผิวเซลล์ ดังนั้นรายงานส่วนใหญ่จึงเน้นการตรวจการแสดงออกของ CD36 บน

ผิวเซลล์มากกว่าการตรวจทางด้านชีวโมเลกุล เทคนิคการตรวจหา CD36 บนผิวเซลล์มีอยู่หลายวิธี เช่น Solid phase red cells adherence (SPRCA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และโฟลไซโตเมทรี (flow cytometry)⁽¹⁷⁾ โดยเทคนิคโฟลไซโตเมทรีเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการทดสอบจากการศึกษาการแสดงออกของ CD36 บนผิวเซลล์ในหลายประชากรทั่วโลก พบว่ามีลักษณะการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละชนชาติ โดยพบรายงานร้อยละของ CD36 deficiency บนผิวเกล็ดเลือดในชาวผิวขาวร้อยละ 0.3 ในชาวแอฟริการ้อยละ 8 ในชาวเอเชีย ได้แก่ จีน จีนเซียงไฮ้ มาเลเซีย ญี่ปุ่น ฮองกง เกาหลี และญี่ปุ่น พบลักษณะ CD36 deficiency บนผิวเกล็ดเลือดอยู่ในช่วง/ร้อยละ 1 ถึง 8⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษา CD36 deficiency ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร พบว่า ร้อยละ 1.67 ไม่มีการแสดงออกของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือด⁽¹⁹⁾ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการแสดงออกของ CD36 บนผิวเซลล์ในชาวไทยที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและตรวจหาร้อยละ CD36 deficiency (type 1 และ type 2) ในผู้บริจาคโลหิตชาวไทยที่มีสุขภาพดีและอาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างทดสอบ

ตัวอย่างเลือดรวมที่เหลือจากงานประจำวัน คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวนรวม 200 ราย แบ่งเป็นผู้บริจาคเกล็ดเลือด (single donor platelets) จำนวน 70 ราย และผู้บริจาคโลหิตเป็นประจำ (บริจาคมากกว่า 5 ครั้ง) จำนวน 130 ราย โดยตัวอย่างเลือดทุกรายเจาะเก็บและถูกทดสอบหาโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือดในระยะเวลาภายใน 12 ชั่วโมง และในตัวอย่างที่ตรวจหาโมเลกุล CD36 บนผิว

โมโนไซต์ จะถูกทดสอบหลังเจาะเก็บเลือดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE 581230

2. การเตรียมเกล็ดเลือด

เตรียมเกล็ดเลือดจากเลือดรวมในสารกันเลือดแข็งชนิด ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร โดยนำเลือดรวมมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 400 g นาน 10 นาที จะได้พลาสมาที่เป็น platelet rich plasma (PRP) จากนั้นนำส่วนพลาสมาปั่นเพื่อตกตะกอนเกล็ดเลือดที่ความเร็ว 1,800 g นาน 5 นาที เก็บตะกอนเกล็ดเลือดและนำมาล้างด้วย 0.2% bovine serum albumin (BSA) - phosphate buffer saline (PBS)/EDTA ที่ความเร็ว 1,800 g เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ได้ประมาณ 2×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วย 0.2% BSA-PBS/EDTA

3. การเตรียมโมโนไซต์

เตรียม peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ด้วยน้ำยา ficoll จากเลือดรวมในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ปริมาตร 6 มิลลิลิตร โดยดูดเลือดรวมขึ้นมาแล้วค่อย ๆ ปล่อยให้ลงบนน้ำยา ficoll จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 352 g นาน 30 นาที นำส่วน PBMC มาปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็วรอบ 1800 g นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ได้ประมาณ 2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร ด้วย 1% BSA-PBS

4. การทดสอบหาโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ด้วยเทคนิคโฟลไซโตเมทรี

ในการศึกษาการแสดงออกของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ ได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการย้อมเซลล์ทั้งหมด 4 ชนิดด้วยกัน ได้แก่ 1) โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD41 (ไกลโคโปรตีน IIb) ใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเป็นเกล็ดเลือด 2) โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD14 ซึ่งเป็นตัวรับสาร Lipopolysaccharide ใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเป็นโมโนไซต์ 3) โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD36 ใช้ตรวจหาโมเลกุล CD36 บนผิวเซลล์ และ 4) CD36 isotype control ใช้เป็นตัวควบคุมลบ (negative control)

4.1 ขั้นตอนการย้อมเกล็ดเลือดด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการทดสอบจำนวน 2 หลอด ประกอบด้วย หลอดที่ 1 หลอดควบคุม นำเกล็ดเลือดที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาย้อมด้วย PE mouse isotype CD36 control (Clone G155-228, IgM, BD Biosciences) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ PC5 mouse anti-human CD41 (Clone P2, IgG1, Beckman Coulter) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หลอดที่ 2 หลอดทดสอบ นำเกล็ดเลือดที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาย้อมด้วย PE mouse anti-human CD36 (Clone CB38, IgM, BD Biosciences) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ PC5 mouse anti-human CD41 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำหลอดทั้งสองวางไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาในที่มีด นาน 20 นาที จากนั้นนำทั้งสองหลอดมาปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย 0.2% BSA-PBS/EDTA ที่ความเร็ว 1,800 g เป็นเวลา 5 นาที เทส่วน supernatantทิ้ง แล้วเติม 0.2% BSA-PBS/EDTA ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และนำไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตเมทรี (FC500 MCL; Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) ศึกษาการแสดงผลของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดโดยกำหนดจำนวนเซลล์ที่วัดเท่ากับ 20,000 เซลล์ เมื่อพบว่าตัวอย่างรายใดมีค่า median fluorescence intensity (MFI) ของหลอดทดสอบ มากกว่า MFI ของหลอดควบคุม จะแปลผลว่ามีการแสดงผลของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือด และหากตัวอย่างรายใดมีค่า MFI ของหลอดทดสอบน้อยกว่าหรือเท่ากับค่า MFI ของหลอดควบคุม จะแปลผลว่าไม่พบ CD36 บนผิวเกล็ดเลือด (รูปที่ 1) และจะนำตัวอย่างที่ไม่พบ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดมาศึกษาการแสดงผลของโมเลกุล CD36 บนผิวโมโนไซต์ต่อไป

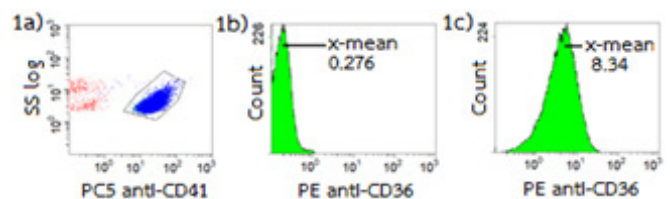
4.2 ขั้นตอนการย้อมโมโนไซต์ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการทดสอบจำนวน 2 หลอด ประกอบด้วย หลอดที่ 1 หลอดควบคุม นำ PBMC ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาย้อมด้วย PE mouse isotype CD36 control ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ PerCP mouse anti-human CD14 (Clone 18D11, IgG1, Immunotools) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร หลอดที่ 2 หลอดทดสอบ นำ PBMC ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาย้อมด้วย PE mouse

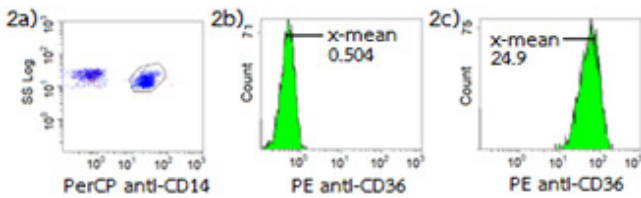
anti-human CD36 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ PerCP mouse anti-human CD14 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำหลอดทั้งสองวางไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาในที่มีด นาน 20 นาที จากนั้นนำหลอดทั้งสองมาปั่นล้าง 2 ครั้งด้วย 0.2% BSA-PBS/EDTA ที่ความเร็ว 1,800 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม 0.2% BSA-PBS/EDTA ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และนำไปวัดด้วยเครื่องโฟลไซโตเมทรี ศึกษาการแสดงผลของ CD36 บนผิวโมโนไซต์โดยกำหนดจำนวนเซลล์ที่วัดเท่ากับ 5,000 เซลล์ เมื่อพบว่าตัวอย่างรายใดมีค่า MFI ของหลอดทดสอบมากกว่า MFI ของหลอดควบคุม จะแปลผลว่ามีการแสดงผลของ CD36 บนผิวโมโนไซต์ และหากตัวอย่างรายใดมีค่า MFI ของหลอดทดสอบน้อยกว่าหรือเท่ากับค่า MFI ของหลอดควบคุม จะแปลผลว่าไม่พบการแสดงผลของ CD36 บนผิวโมโนไซต์ (รูปที่ 2)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 22.0 เปรียบเทียบความถี่ CD36 deficiency ระหว่างประชากรชาวไทย (การศึกษาครั้งนี้) และประชากรอื่น ๆ ด้วยสถิติ chi-square โดยกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$)



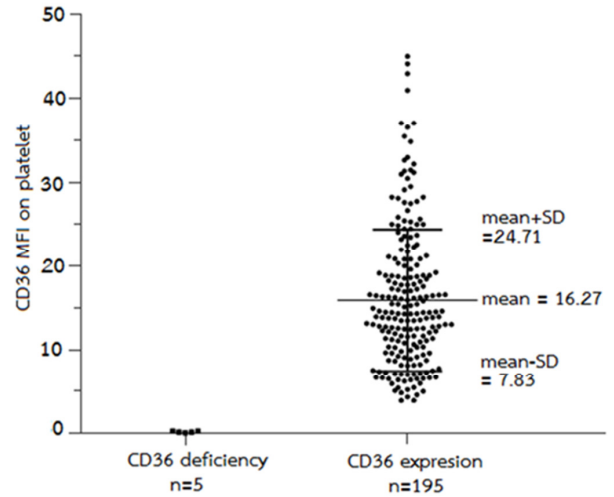
รูปที่ 1 ฮิสโตแกรมแสดงลักษณะการแสดงผลของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือด 1a: ฮิสโตแกรม dot density plot แสดงการเลือกกลุ่มเกล็ดเลือดที่ติดสี PC5 mouse anti-human CD41 ซึ่งสามารถจับกับไกลโคโปรตีน GPIIb บนผิวเกล็ดเลือด (แกน X) ร่วมกับการวิเคราะห์ side scatter (ss) (แกน Y) 1b, 1c: ฮิสโตแกรมแบบ single channel ในตัวอย่างที่ให้ผล CD36 deficiency และ CD36 expression บนผิวเกล็ดเลือด ตามลำดับ โดยแกน X แสดงค่าการติดสี PE mouse anti-human CD36 ซึ่งสามารถจับกับโมเลกุล CD36 และแกน Y แสดงจำนวนเซลล์ที่ตรวจวัด ณ ระดับค่า fluorescent intensity ต่าง ๆ



รูปที่ 2 ฮิสโตแกรมแสดงลักษณะการแสดงออกของ CD36 บนผิวโมโนไซต์ 2a: ฮิสโตแกรม dot density plot แสดงการเลือกกลุ่มโมโนไซต์ ที่ติดสี PerCP mouse anti-human CD14 ซึ่งสามารถจับกับตัวรับ Lipopoly- saccharide บนผิวโมโนไซต์ (แกน X) ร่วมกับการวิเคราะห์ side scatter (ss) (แกน Y) 2b, 2c: ฮิสโตแกรมแบบ single channel ในตัวอย่างที่ให้ผล CD36 deficiency และ CD36 expression บนโมโนไซต์ ตามลำดับ โดยแกน X แสดงค่าการติดสี PE mouse anti-human CD36 ซึ่งสามารถจับกับโมเลกุล CD36 และแกน Y แสดงจำนวนเซลล์ที่ตรวจวัด ณ ระดับค่า fluorescent intensity ต่าง ๆ

ผลการศึกษา

จากการทดสอบหาโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือด ในตัวอย่างจำนวน 200 ราย ด้วยวิธีโพลไซโตเมทรี พบว่ามีตัวอย่างที่พบการแสดงออกของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดจำนวน 195 ตัวอย่าง มีค่า MFI อยู่ระหว่าง 4.41 ถึง 44.90 โดยมีค่า mean \pm SD ของค่า MFI เท่ากับ 16.27 ± 8.44 (รูปที่ 3) จากนั้นทดสอบหา CD36 บนผิวโมโนไซต์ ในตัวอย่างที่ไม่พบ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดจำนวน 5 ราย พบว่ามีการแสดงออกของ CD36 บนผิวโมโนไซต์ทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าพบลักษณะ CD36 expression อยู่ร้อยละ 97.5 พบลักษณะ CD36 type 2 deficiency อยู่ร้อยละ 2.5 และไม่พบลักษณะ CD36 type 1 deficiency ในประชากรกลุ่มนี้



รูปที่ 3 แสดงการกระจายตัวของค่า median fluorescent intensity (MFI) ในตัวอย่างจำนวน 200 ราย ที่ทดสอบการแสดงออกของโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือด จากรูปแสดงให้เห็นว่าค่า MFI ของกลุ่มตัวอย่างที่มีการแสดงออกของ CD36 มีความแตกต่างกัน โดยมีค่าเฉลี่ย (mean) MFI เท่ากับ 16.27 และค่า SD เท่ากับ 8.44

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

โมเลกุล CD36 สามารถตรวจพบบนเซลล์ที่ตั้งแต่วัยสเต็มเซลล์ (bi-potential precursor cells)⁽²⁰⁾ โดยเซลล์บางชนิดจะไม่พบการแสดงออกของ CD36 เมื่อเซลล์นั้นเติบโตเต็มที่ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง แต่เซลล์บางชนิดสามารถตรวจพบปริมาณ CD36 ได้มากขึ้นเมื่อเซลล์นั้นโตเต็มที่ เช่น เมกาคาโรไซต์ เกล็ดเลือด และโมโนไซต์⁽²¹⁾ ในการศึกษาครั้งนี้สามารถพัฒนาเทคนิคโพลไซโตเมทรี สำหรับตรวจหา CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ได้ วิธีการตรวจพีโนไทป์ของ CD36 ด้วยเทคนิคโพลไซโตเมทรี มีข้อดีคือ มีความถูกต้องแม่นยำและมีความไวในการตรวจสูง แต่มีข้อจำกัดคือน้ำยาและเครื่องมือมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นจึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการพิเศษที่มีเครื่องโพลไซโตเมทรี

จากรายงานวิจัยพบว่าระยะเวลาที่ตรวจวัดปริมาณ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ด้วยวิธีโพลไซโตเมทรี แล้วไม่ทำให้ค่า MFI ที่ตรวจวัดเปลี่ยนแปลง

ไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือควรทดสอบเกล็ดเลือดและโมโนไซต์หลังเจาะเก็บเลือดภายใน 24 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ⁽²²⁾ ซึ่งงานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างเลือดรวมและนำมาทดสอบหาโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือดหรือโมโนไซต์ภายในระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากผลการทดสอบหาโมเลกุล CD36 บนผิวเกล็ดเลือดในตัวอย่างชาวไทยที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 200 ราย พบว่ามีระดับโมเลกุล CD36 ที่แสดงออกบนผิวเกล็ดเลือดจำนวน 195 ราย โดยมีการแสดงออกของโมเลกุล CD36 ในระดับที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละบุคคล โดยมีค่า MFI ตั้งแต่ 4.41 ถึง 44.90 (รูปที่ 3) มีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าระดับ CD36 ที่แตกต่างกันในแต่ละบุคคล สัมพันธ์ต่อความรุนแรงของโรค เช่น ในเด็กที่ติดเชื้อมาลาเรียอาการรุนแรง พบว่ามีระดับ CD36 แสดงออกบนผิวโมโนไซต์มากกว่ากลุ่มที่ติดเชื้อแล้วมีอาการที่ไม่รุนแรง⁽²³⁾ โมเลกุล CD36 นอกจากจะพบบนผิวเซลล์แล้ว ยังสามารถตรวจพบได้ในพลาสมาอีกด้วย มีงานวิจัยระบุว่าโมเลกุล CD36 ที่ตรวจพบในพลาสมาสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้⁽⁴⁾ ดังนั้นในการศึกษาระดับการแสดงออกของโมเลกุล CD36 ในร่างกายมนุษย์ จึงควรศึกษาทั้งที่แสดงออกบนผิวเซลล์และที่พบในพลาสมา

เมื่อเปรียบเทียบร้อยละ CD36 deficiency ในชาวไทยที่อาศัยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและกลุ่มประชากรอื่น ๆ พบว่า ร้อยละของ CD36 deficiency มีความใกล้เคียงกับชาวเอเชียแต่น้อยกว่าชาวแอฟริกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ในผู้ป่วยที่มีลักษณะ CD36 type I deficiency หากได้รับเกล็ดเลือดจากผู้บริจาคที่มีโมเลกุล CD36 บนผิวเซลล์ ร่างกายผู้ป่วยสามารถถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีต่อโมเลกุล CD36 ที่ได้รับเข้าไปได้ จากรายงานวิจัยพบการเกิดภาวะ immune-mediated thrombo-cytopenia จากแอนติบอดีต่อ CD36 ในชาวเอเชียร้อยละ 18.35⁽²⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบผู้ป่วยอย่างละ 1 ราย ที่เกิดภาวะ FNAIT และ PTR จากแอนติบอดีต่อ CD36 ในชาวไทยอีกด้วย^(24,25) อย่างไรก็ตามการศึกษาคั้งนี้ไม่พบลักษณะ CD36 type I deficiency ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดภาวะ

immune-mediated thrombocytopenia จากแอนติบอดีต่อ CD36 น่าจะพบได้น้อยในประชากรกลุ่มนี้

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าร้อยละ CD36 deficiency ในกลุ่มประชากรต่าง ๆ

กลุ่มประชากร	จำนวน (ราย)	CD36 deficiency (ร้อยละ)		
		Type 1	Type 2	Type 1 และ 2
ไทย (การศึกษานี้)	200	0.00	2.50	2.50
ไทย (กรุงเทพฯ) ⁽¹⁹⁾	598	ND	ND	1.67
จีนเซี่ยงไฮ้ ⁽²⁶⁾	1022	0.20	2.00	2.20
จีนตอนล่าง ⁽²⁷⁾	998	0.50	1.30	1.80
ฮ่องกง ⁽¹⁸⁾	140	0.00	1.43	1.43
เกาหลี ⁽²⁸⁾	220	0.90	3.20	4.10
ญี่ปุ่น ⁽¹⁶⁾	827	1.00	5.80	6.80
มาเลเซีย ⁽¹⁸⁾	200	0.50	1.50	2.00
ออสเตรเลีย ⁽¹⁸⁾	200	0.00	0.00	0.00
ฝรั่งเศส ⁽²⁹⁾	1127	0.00	0.00	0.00
แอฟริกา ⁽²⁹⁾	206	2.90	7.77*	10.67*

ND = not done; ยังไม่ทำการศึกษาศึกษา

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ของร้อยละ CD36 deficiency เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้

มีรายงานพบว่าตัวอย่างที่เกิดมิวเทชัน C268T, 1228-1239 delATTGTGCCTATT และ 329-330 delAC จะมีรูปแบบการแสดงออกของโมเลกุล CD36 บนผิวเซลล์ที่ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามในตัวอย่างบางรายที่ให้ผลพีโนไทป์เป็น CD36 deficiency กลับตรวจไม่พบมิวเทชันในยีน CD36⁽²⁰⁾ ดังนั้นในปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการเกิดมิวเทชันชนิดใดและตำแหน่งไหนบ้างที่ควบคุมการแสดงออกของ CD36 บนผิวเซลล์ ในอนาคตควรมีการศึกษาเกี่ยวกับยีน CD36 รวมทั้งการศึกษาทางด้านเอพิเจเนติก (epigenetic) เพิ่มเติมต่อไป การศึกษาคั้งนี้เป็นการศึกษาข้อมูลพื้นฐานของ CD36 บนผิวเกล็ดเลือดและโมโนไซต์ ซึ่งอาจจะสัมพันธ์กับโรคที่เกี่ยวข้องได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (IN59168) และขอขอบคุณผู้บริจาคโลหิต ที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992; 80: 1105-15.
2. Behm FG. Cell biology and pathobiology: Immunophenotyping. In: Pui CH, ed. *Childhood Leukemias*. 3rd. ed. New York: Cambridge University Press, 2012: 73-9.
3. Jay AG, Chen AN, Paz MA, Hung JP, Hamilton JA. CD36 binds oxidized low density lipoprotein (LDL) in a mechanism dependent upon fatty acid binding. *J Biol Chem* 2015; 290(8): 4590-603.
4. Handberg A, Norberg M, Stenlund H, Hallmans G, Attermann J, Eriksson JW. Soluble CD36 (sCD36) clusters with markers of insulin resistance, and high sCD36 is associated with increased type 2 diabetes risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(4): 1939-46.
5. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al. The large diverse gene family encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 1995; 82: 89-100.
6. Amakishi E, Hayashi T, Koh Y, Matsuyama N, Ishii H, Matsukura H, et al. A new transfectant panel cells line-based MoAb-independent antigen capture assay system for detection of CD36 antibody. *Vox Sang* 2014; 106: 368-71.
7. 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.
8. Warkentin TE, Smith JW. The alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfus Med Rev* 1997; 11: 296-307.
9. Taketani T, Ito K, Mishima S, Kanai R, Uchiyama A, Hirata 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.
10. Nakajima F, Nishimura M, Hashimoto S, Okazaki K, Tadokoro K. Role of anti-Naka antibody, monocytes and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang* 2008; 95: 318-23.
11. Kumawat V, Sharma RR, Malhotra P, Marwaha N. Prevalence of risk factors for platelet transfusion refractoriness in multitransfused hemato-oncological patients at tertiary care center in North India. *Asian J Transfus Sci* 2015; 9(1): 61-4.
12. Dutcher JP, Schiffer CA, Aisner J, Wiernik PH. Long-term follow-up patients with leukemia receiving platelet transfusions: identification of a large group of patients who do not become alloimmunized. *Blood* 1981; 58(5): 1007-11.
13. Promwong C, Buakaew J. Prevalence and Diagnosis of Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia using Flow Cytometry. *J Hematol Transfus Med* 2010; 20: 179-89.
14. Leelasiri A. Optimal use of blood component. *Royal Thai Army Medical Journal* 2010; 63(1): 33-8.

15. Zhang Y, Ling ZY, Deng SB, Du HA, Yin YH, Yuan J, et al. Associations between CD36 gene polymorphisms and susceptibility to coronary artery heart disease. *Braz J Med Biol Res* 2014; 47(10): 895–903.
16. Yanai H, Chiba H, Fujiwara H, Morimoto M, Abe K, Yoshida S, et al. Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II. *Thromb Haemost* 2000; 84: 436-41.
17. Hayashi T, Hirayama F. Advances in alloimmune thrombocytopenia: perspectives on current concepts of human platelet antigens, antibody detection strategies, and genotyping. *Blood Transfus*. 2015; 13(3): 380–90.
18. Xia W, Xu X, Fu Y, Ye X, Tsuno N, Santoso S, et al. CD36 deficiency among South-East Asian populations. *ISBT Science Series* 2016; 52: 33-6.
19. Lerkchai C, Srisuddee A, Inon K, Kupatawintu P, Peanjalern S, Kengkate M, et al. The Preliminary Study: The Detection of Naka Antigen by Flow Cytometry in Platelet Donors at National Blood Centre; 23th Annual Academic Meeting of National Blood Centre 2015 (Abstract book). Thailand 2015.
20. Chen L, Gao Z, Zhu J, Rodgers GP. Identification of CD13+CD36+ cells as a common progenitor for erythroid and myeloid lineages in human bone marrow. *Exp Hematol* 2007; 35(7): 1047-55.
21. Attar A. Changes in the Cell Surface Markers During Normal Hematopoiesis: A Guide to Cell Isolation. *Glob J Hematol Blood Transfus* 2014; 1: 20-8.
22. Cserti CM, Xu S, Sutherland R, Nayar R, Reis M, Dorn ME, et al. Quantitative Flow Cytometric Assessment of CD36 (Platelet Glycoprotein IV) Expression on Monocytes and Platelets: Assay Development, Role in Plasmodium falciparum Risk Assessment, and Relationship to Sick Hemoglobin. *Blood* 2007; 110: 3857-9.
23. Cserti-Gazdewich CM, Dhabangi A, Musoke C, Ssewanyana I, Ddungu H, Nakiboneka-Ssenabulya D, et al. Cytoadherence in paediatric malaria: ABO blood group, CD36, and ICAM1 expression and severe Plasmodium falciparum infection. *Br J Haematol* 2012; 159(2): 223-36.
24. Wu GG. Detection of clinically relevant platelet antibodies in the Asian population. *ISBT Sci Ser* 2014; 9: 112-7.
25. Peanjarean S, Kanoonthong S. Identification of Anti - Naka Antibody in Platelet Transfusion Patient: A Case Report; 25th Annual Academic Meeting of National Blood Centre 2017 (Abstract book). Thailand 2017.
26. Li R, Qiao Z, Ling B, Lu P, Zhu Z. Incidence and molecular basis of CD36 deficiency in Shanghai population. *Transfusion* 2015; 55(3): 666-73.
27. 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(6): 1199-206.
28. Chung Y, Hwang SM, Kim MS, Hong YJ, Kim TS, Park KU, et al. Frequency of CD36 Deficiency on Platelets and Monocytes in Koreans. *Korean J Blood Transfus* 2014; 25(1): 28-33.
29. 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(8): 873-9.