



การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการตรวจวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในเลือด ครบโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดียว

นันทรัตน์ โฆมานะสิน¹, ไพศาล มงคลวงศ์โรจน์¹, ยศสมบัติ จังตระกุล²

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในเลือดครบ โดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดียว ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติหลังจากเติมสารตัวกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ซึ่งได้ดัดแปลงเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากวัสดุและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น เครื่องวนสารละลายที่ปรับความเร็วรอบและอุณหภูมิได้ เทอร์โมมิเตอร์ แท่งแม่เหล็กขนาดเล็ก และบีกเกอร์ เป็นต้น ซึ่งแสดงค่าการตรวจวัดเป็น % remaining platelets ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมและเปรียบเทียบกับวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา ซึ่งแสดงค่าเป็น % maximum aggregation จากการศึกษาโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดียวพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบคือ ความเร็วรอบที่ใช้ในการวน (stirring speed) 500 รอบ/นาที ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของ ADP 5 ไมโครโมลาร์ collagen 2.5 ไมโครกรัม/มล. และเวลาที่เริ่มมีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุดคือ 1 นาที เมื่อกระตุ้นด้วย ADP และ 3 นาที เมื่อกระตุ้นด้วย collagen เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดียวกับวิธีวัดความขุ่นของพลาสมาในตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครจำนวน 20 ราย พบว่า % remaining platelets เมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย ADP 5 ไมโครโมลาร์ และ collagen 2.5 ไมโครกรัม/มล. เท่ากับ 28.2 ± 23.4 และ $29.1 \pm 26.5\%$ ($\bar{X} \pm SD$) ตามลำดับ และ % maximum aggregation มีค่าเท่ากับ 56.0 ± 21.0 และ $52.2 \pm 27.9\%$ ($\bar{X} \pm SD$) ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์เชิงเส้นในทิศทางตรงกันข้าม (negative linear correlation) โดยมีค่า r เท่ากับ -0.51 ($p = 0.001$) เมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย ADP 5 ไมโครโมลาร์ และเท่ากับ -0.41 ($p = 0.012$) เมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย collagen 2.5 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งผลการศึกษาสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการจัดตั้งการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดียวในโรงพยาบาลทั่วไปได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

คำรหัส: เกล็ดเลือด • การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด • เกล็ดเลือดเดียว

บทนำ

การทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation test) เป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างหนึ่งที่ใช้ประกอบการวินิจฉัยผู้ป่วยที่มีภาวะเลือดออกผิดปกติ ซึ่งมีสาเหตุจากความผิดปกติในหน้าที่ของเกล็ดเลือด วิธีที่นิยมใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ การทดสอบ

โดยวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา (turbidometric method)¹ โดยอาศัยหลักการวัดการดูดกลืนแสงของพลาสมาที่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเกิดขึ้น วิธีนี้มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถทดสอบในเลือดครบ (whole blood) ได้ การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นจึง

¹ ภาควิชาจุลทรรศน์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² หน่วยจุลทรรศน์วินิจฉัย โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Preliminary study of whole blood platelet aggregation using a single platelet counting technique

Nantarat Komanasin¹, Paisal Mongkolwongroj¹, Yotsombat Changtrakun²

Abstract

Preliminary study of platelet aggregation in whole blood has been carried out by a single platelet counting technique expressed in % remaining platelets, and the optimal conditions were studied. The instrument for performing platelet aggregation was modified from a simple equipment in the laboratory such as a hot plate with magnetic stirrer, a thermometer, a magnetic stir bar and a beaker. The optimal stirring speed as well as the final concentrations of ADP and collagen were 500 rpm, 5 μ M and 2.5 μ g/ml, respectively. The maximum aggregation occurred within 1 and 3 minutes after adding ADP and collagen, respectively. Then platelet aggregation test was performed on 20 healthy volunteers using selected optimal conditions for platelet counting technique and turbidometric technique. Percent of the remaining platelets activating by ADP and collagen were 28.2 ± 23.4 and $29.1 \pm 26.5\%$ ($\bar{X} \pm SD$), respectively. While the percent maximum aggregation were 56.0 ± 21.0 and $52.2 \pm 27.9\%$ ($\bar{X} \pm SD$). Significant negative correlations between % remaining platelets and % maximum aggregation activating by ADP and collagen were also found ($r = -0.51$; $p = 0.001$ and $r = -0.41$; $p = 0.012$, respectively). This study provides a fundamental information for setting up a simple and inexpensive technique for platelet aggregation test in a clinical laboratory.

Keywords: platelet • platelet aggregation • a single platelet

ไม่เหมือนกับที่เกิดในร่างกาย ซึ่งมีการหลั่งสารจากเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงเข้ามาเกี่ยวข้อง^{2,3} นอกจากนี้ในการปั่นเลือดเพื่อเตรียมพลาสมาชนิดที่มีเกล็ดเลือดมาก (platelet rich plasma; PRP) ยังอาจทำให้สูญเสียเกล็ดเลือดที่มีความหนาแน่นมาก และ/หรือเกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ จึงได้มีการคิดค้นวิธีการทดสอบการเกาะกลุ่มของเลือดในเลือดครบ โดยอาศัยหลักการวัดความต่างศักย์ระหว่างอิเล็กโทรด 2 อัน ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อมีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (impedance method)⁴ เป็นวิธีที่สามารถทดสอบได้ทั้งในพลาสมาและเลือดครบ

แต่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง และยังพบว่ามีความไวค่อนข้างต่ำต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดขนาดเล็ก จึงได้มีการพัฒนาเป็นการนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวที่เหลืออยู่หลังจากเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (single platelet counting technique)⁵⁻⁹ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดขนาดเล็ก แต่อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลทำให้ความไวของวิธีนี้มีความแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา Lumley และคณะ⁶ Saniabadi และคณะ⁷ และ Cheeseman และคณะ⁸ ได้ศึกษาโดยนับเกล็ดเลือดด้วยเครื่องนับ

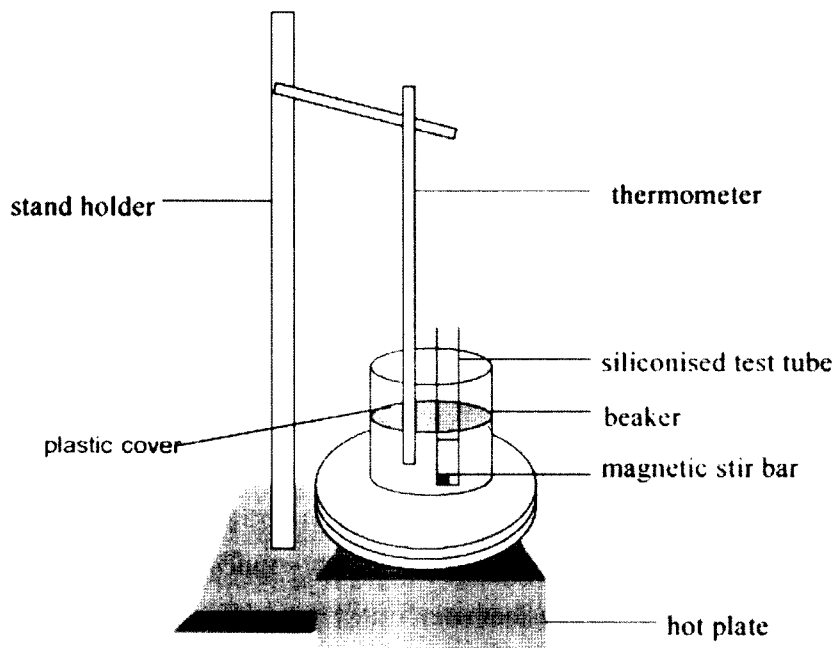
¹ Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

² Unit of Diagnostic Microscopy, Srinagarin Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

เกล็ดเลือดอัตโนมัติ (Ultra Flo 100 whole blood platelet counter) Lumley และคณะ ใช้ ADP ที่มีความเข้มข้น 1.1 ไมโครโมลาร์ ในการทำให้จำนวนเกล็ดเลือดลดลง 50% ในขณะที่ Saniabadi และคณะ และ Cheeseman และคณะใช้ความเข้มข้นของ ADP 0.15 ไมโครโมลาร์ และ 0.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่ง Falcon และคณะ⁹ เสนอว่าความไวที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากสถานะของการทดสอบที่แตกต่างกัน จึงได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทดสอบโดยวิธีนี้ เพื่อที่จะทราบสถานะที่เหมาะสม ซึ่งปัจจัยดังกล่าวได้แก่ จำนวนรอบของการกวน (stirring speed) ความเข้มข้นของสารที่ใช้ตรึง (fixative) เวลาที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นต้น การวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในเลือดครบโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวซึ่งได้ประยุกต์ให้เหมาะสมกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ และศึกษาเปรียบเทียบวิธีดังกล่าวกับวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา

วัสดุและวิธีการ

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ ในการวิจัยครั้งนี้ได้ประกอบด้วยชุดอุปกรณ์สำหรับทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว ซึ่งประกอบด้วยเครื่องกวนสารละลายที่ปรับความเร็วรอบของการกวนและอุณหภูมิได้ (hot plate with magnetic stirrer; Heidolph) บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50 มล. ปิดปากด้วยแผ่นพลาสติกแข็งที่เจาะรูตรงกลางเพื่อใส่คิ่วเวตต์ และเจาะรูด้านข้างเพื่อใส่เทอร์โมมิเตอร์ และตัวยึด (stand holder) สำหรับยึดเทอร์โมมิเตอร์ ซึ่งชุดอุปกรณ์ที่ประกอบแล้วมีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 1 นับจำนวนเกล็ดเลือดโดยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ (automated cell counter; Coulter STKS) สำหรับการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา ใช้เครื่องทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (aggregometer; BioData Corporation, PAP-2A)



รูปที่ 1 อุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นเองสำหรับทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว สภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษา ได้แก่ จำนวนรอบของการกวน (stirring speed) ความเข้มข้นของสารตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด และเวลาที่ใช้ในการเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด (% maximum aggregation) การศึกษาจำนวนรอบที่เหมาะสมนั้น ใช้เลือดจากอาสาสมัครจำนวน 5 ราย จำนวนรอบของการกวนที่ใช้ได้แก่ 100, 250, 500, 750 และ 1,000 รอบ/นาที วิธีการทดสอบเริ่มจากการปรับอุณหภูมิของน้ำในบีกเกอร์ให้เท่ากับ 37 °C ก่อนเริ่มการทดสอบ เติมน้ำเลือด 1 มล. ลงในคิวเวตต์กันตวัดที่เคลือบด้วยซิลิโคน วางในบีกเกอร์ แล้วอุ่นเป็นเวลานาน 3 นาที ดูดเลือด 60 ไมโครลิตร เติมน้ำใน 240 ไมโครลิตร ของ 0.47% formaldehyde (เตรียมโดยเจือจาง 40% formaldehyde 0.35 มล. ด้วย isotonic solution 2.65 มล. ซึ่งต้องเตรียมก่อนใช้) แล้วนำไปนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ ใส่แท่งแม่เหล็กลงในไปเลือดที่เหลืออยู่ โดยปรับความเร็วรอบของเครื่องกวนสารละลายให้แท่งแม่เหล็กหมุนในอัตราที่ต้องการ จับเวลา 1, 2, 3....., 10 นาที หลังจากใส่แท่งแม่เหล็ก เมื่อครบเวลาดังกล่าว ดูดเลือด 60 ไมโครลิตร เติมน้ำใน 0.47% formaldehyde 240 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวที่เวลาต่างๆ คำนวณ % remaining platelets จากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ remaining platelets} = \frac{\text{Plt t} \times 100}{\text{Plt b}}$$

Plt t = จำนวนเกล็ดเลือดหลังใส่แท่งแม่เหล็กที่เวลา t

Plt b = จำนวนเกล็ดเลือดก่อนใส่แท่งแม่เหล็ก

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด ใช้เลือดจากอาสาสมัครจำนวน 2 ราย ทำโดยปรับความเร็วรอบของ

เครื่องกวนสารละลายให้อยู่ที่ความเร็วรอบที่เหมาะสม (500 รอบ/นาที) และเติมสารตัวกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดก่อนเริ่มจับเวลา 1,2,3,4 และ 5 นาที สารตัวกระตุ้นที่ใช้ได้แก่ ADP; grade III (Sigma® Chemical Co.) ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.25, 2.5, 5, 7.5 และ 10 ไมโครโมลาร์ และ collagen (Helena) ซึ่งมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/มล.

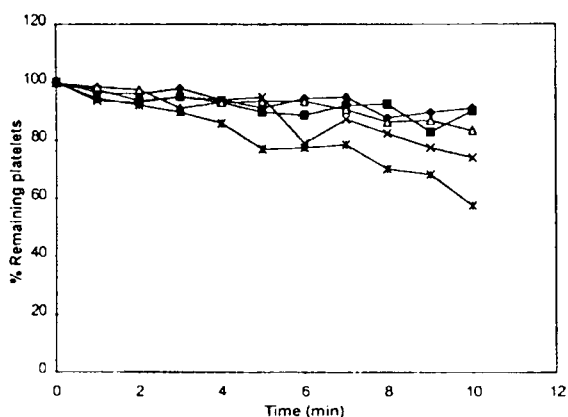
สำหรับการศึกษาเวลาที่ใช้ในการเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด ใช้เลือดจากอาสาสมัครจำนวน 20 ราย ทำการทดสอบโดยใช้ ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.25, 2.5 และ 5 ไมโครโมลาร์ และ collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 ไมโครกรัม/มล. เป็นตัวกระตุ้น ปรับความเร็วรอบของเครื่องกวนสารละลายเป็น 500 รอบ/นาที และจับเวลาหลังเติมสารตัวกระตุ้นเป็น 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที

3. ศึกษาเปรียบเทียบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในคนปกติด้วยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวในเลือดครบและวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา โดยใช้ ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครโมลาร์ และ collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 ไมโครกรัม/มล. โดยเจาะเลือดจากอาสาสมัครจำนวน 20 ราย ซึ่งไม่ได้รับประทานยาชนิดใดๆ ที่มีผลต่อหน้าที่ของเกล็ดเลือด ก่อนการเจาะเลือดอย่างน้อย 2 สัปดาห์ และไม่ได้สูบบุหรี่เป็นประจำ เจาะเลือดประมาณ 20-25 มล. โดยใช้ 3.8% trisodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็งในอัตราส่วนระหว่างเลือดและสารกันเลือดแข็งเท่ากับ 9:1 แล้วเตรียมเป็นพลาสมาชนิด PRP ซึ่งปรับปริมาณเกล็ดเลือดในพลาสมาให้มีค่าเท่ากับ 300×10^9 /ลิตร ด้วย PPP

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวและวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา โดยใช้สถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)

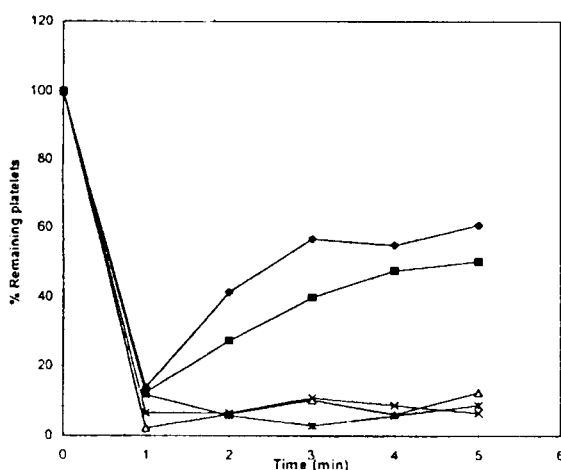
ผลการศึกษา

1. ผลของความเร็วยรอบในการหมุนของแท่งแม่เหล็กต่อการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว จากการทดลองปรับความเร็วรอบของเครื่องกวนสารละลายที่ 100, 250, 500, 750 และ 1,000 รอบ/นาที พบว่า ความเร็วยรอบที่ 100, 250 และ 500 รอบ/นาที ไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันเองของเกล็ดเลือด กล่าวคือ % remaining platelets เปลี่ยนแปลงไม่เกิน 10% ในแต่ละช่วงเวลา (รูปที่ 2) สำหรับความเร็วยรอบที่ 750 รอบ/นาที % remaining platelets เริ่มลดลงอย่างชัดเจนที่นาทีที่ 4 และลดลงเรื่อยๆ เมื่อเวลามากขึ้น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ความเร็วยรอบในการหมุนของแท่งแม่เหล็กที่ 500 รอบ/นาที ซึ่งเป็นความเร็วยรอบที่มากที่สุดและไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันเองของเกล็ดเลือด



รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ % remaining platelets เมื่อปรับความเร็วยรอบของการกวน เป็น 100, 250, 500, 750 และ 1,000 รอบ/นาที (n = 5)
◆, ■, ▲, × และ * : 100, 250, 500, 750 และ 1,000 รอบ/นาที

2. ความเข้มข้นของสารตัวกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด พบว่า ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.25 และ 2.5 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นแบบไม่ถาวร (reversible) กล่าวคือ % remaining platelets ลดลงต่ำสุดแล้วในเวลาต่อมาก็จะเพิ่มขึ้น (รูปที่ 3) ในขณะที่ ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5, 7.5 และ 10 ไมโครโมลาร์ ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเป็นแบบถาวร (irreversible) และ % remaining platelets ที่ ADP 5 ไมโครโมลาร์มีค่าต่ำสุด (2.1%) ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครโมลาร์ สำหรับกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดแบบถาวร สำหรับ collagen ให้ผลเหมือนกันทั้งที่ความเข้มข้น 2.5, 5

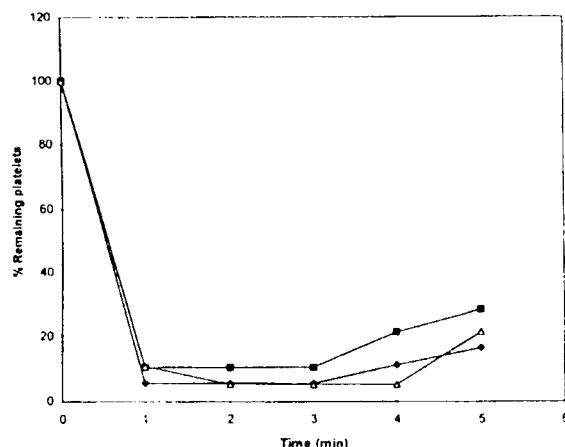


รูปที่ 3: ค่าเฉลี่ยของ % remaining platelets เมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย เป็น 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 ไมโครโมลาร์ (n = 2)
◆, ■, ▲, × และ * : ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

และ 10 ไมโครกรัม/มล. (รูปที่ 4) จึงเลือกใช้ collagen ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 2.5 ไมโครกรัม/มล.

3. เวลาที่สารตัวกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด เมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครโมลาร์ พบว่า % remaining platelets ลดลงต่ำสุดที่เวลา 1 นาที สำหรับ collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 ไมโครกรัม/มล. % remaining platelets ลดลงต่ำสุดที่เวลา 3 นาที (รูปที่ 5)

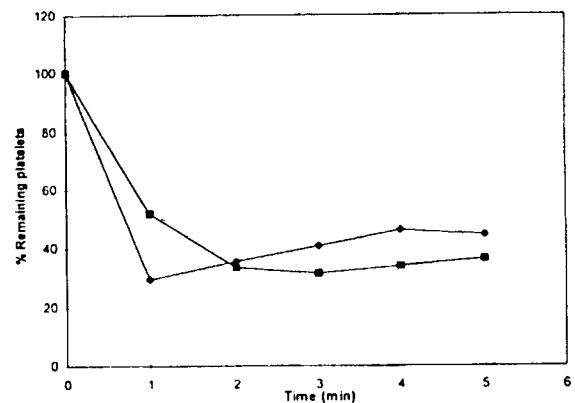
4. เปรียบเทียบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในคนปกติ โดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว และวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา จากการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในคนปกติจำนวน 20 ราย พบว่าค่าเฉลี่ย



รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยของ % remaining platelets เมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัม/มล. (n = 2)

◆, ■, และ ▲ : collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัม/มล. ตามลำดับ

และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด และ % remaining platelets ที่ ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครโมลาร์ เท่ากับ 56.0 ± 23.1 และ 28.2 ± 23.4 % ตามลำดับ และที่ collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 ไมโครกรัม/มล. เท่ากับ 52.2 ± 27.9 และ 29.1 ± 26.5 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และพบว่าผลที่ได้จากวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวและวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงข้าม เมื่อใช้ ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครโมลาร์ และ collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 ไมโครกรัม/มล. โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ -0.51 (p=0.001) และ -0.41 (p=0.012) ตามลำดับ



รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยของ % remaining platelets เมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5.0 ไมโครโมลาร์ และ collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 ไมโครกรัม/มล. เวลาที่ % remaining platelets ลดลงต่ำสุดคือที่ 1 และ 3 นาที ตามลำดับ (n = 20)

◆ : ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5.0 ไมโครโมลาร์

■ : collagen ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5 ไมโครกรัม/มล.

วิจารณ์ผลการศึกษา

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว แล้วคำนวณเป็น % remaining platelets หลังจากเติมสารตัวกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาเป็นอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นเองจากวัสดุที่มีในห้องปฏิบัติการทั่วไป การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมก่อนการทดสอบจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง จากการศึกษาพบว่าความเร็วรอบของการกวนที่เหมาะสมในการหมุนของแท่งแม่เหล็กคือ 500 รอบ/นาที่ ซึ่งเป็นความเร็วรอบที่มากที่สุดที่ไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันเองของเกล็ดเลือดภายในเวลา 8 นาที ในขณะที่จะมีการเกาะกลุ่มกันเองของเกล็ดเลือดในนาที่ที่ 6 ที่ความเร็วรอบ 750 รอบ/นาที่ และในนาที่ที่ 4 ที่ความเร็วรอบ 1,000 รอบ/นาที่ ในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเร็วรอบของการกวนที่ 500 รอบ/นาที่ ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Falcon และคณะ⁹ ที่ใช้ความเร็วรอบของการกวนเท่ากับ 100 รอบ/นาที่ ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วรอบที่มากขึ้นทำให้ใช้สารตัวกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในความเข้มข้นที่ต่ำลง แม้ว่าความเร็วรอบที่สูงขึ้นอาจทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันเองของเกล็ดเลือดในเลือดครบ^{10,11} แต่ผลการศึกษาเปรียบเทียบ % remaining platelets ที่ความเร็วรอบต่างๆ พบว่าที่ความเร็วรอบ 500 รอบ/นาที่ ไม่มีการเกาะกลุ่มกันเองของเกล็ดเลือดเกิดขึ้นภายในเวลา 5 นาที

เวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมากที่สุด พบว่าเกิดขึ้นในนาที่ที่ 1 เมื่อกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Falcon และคณะ⁹ ที่พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 2 นาที ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเร็วรอบในการกวนของการวิจัยนี้ต่างจากการศึกษาดังกล่าว และเมื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย collagen พบว่า % remaining platelets ลดลงต่ำสุดในนาที่ที่ 3 ซึ่งใช้เวลานานกว่าการกระตุ้นด้วย ADP ทั้งนี้เนื่องจาก collagen เป็น

secondary aggregating agent กล่าวคือ การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเกิดขึ้นหลังจากเกิดปฏิกิริยาการหลังสารของเกล็ดเลือด ดังนั้นก่อนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจะมี lag phase ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา ซึ่งมี lag phase ประมาณ 1-2 นาที

จากการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในคนปกติ พบว่าการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ทดสอบด้วยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว และวิธีวัดความขุ่นของพลาสมา เมื่อกระตุ้นด้วย ADP ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 ไมโครโมลาร์ และ collagen 2.5 ไมโครกรัม/มล. มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงในทิศทางตรงกันข้าม (negative linear correlation) และมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ -0.51 และ -0.41 ตามลำดับ ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระดับปานกลาง นอกจากนี้ยังจะเห็นได้ว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของ % maximum aggregation และ % remaining platelets ค่อนข้างสูงและมีค่าใกล้เคียงกันทั้งสองวิธี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีความแตกต่างกันของการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือดในกลุ่มอาสาสมัครที่ทำการทดสอบมาก¹² นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปริมาณของไกลโคโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับต่อตัวกระตุ้นชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ซึ่งพบว่าปริมาณของไกลโคโปรตีน Ia/IIa ที่เป็นตัวรับต่อ collagen มีความแตกต่างในระหว่างบุคคลมากถึง 10 เท่า¹³ แต่อย่างไรก็ตามหากจะนำวิธีนี้ไปทำการตรวจวัดในผู้ป่วย ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของจำนวนเกล็ดเลือดตั้งต้นในเลือดครบต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด แม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเกล็ดเลือดกับการเปลี่ยนแปลงของ % remaining platelets (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนเกล็ดเลือดของอาสาสมัครในการศึกษานี้อยู่ในช่วงปกติทุกราย แต่หากจำนวนเกล็ดเลือดต่ำหรือสูงกว่าปกติอาจมีผลต่อการตรวจวัด

สรุป

จากผลการวิจัยนี้อาจกล่าวได้ว่าห้องปฏิบัติการที่ไม่มีงบประมาณสำหรับจัดซื้อเครื่องทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดซึ่งมีราคาแพง ก็สามารถทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวได้ และหากต้องการทราบรูปแบบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (aggregation pattern) ก็สามารถทำได้โดยการนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยว (ทุกๆ นาทีจนครบ 5 นาที) แล้ววาดกราฟระหว่าง % remaining platelets และเวลา ซึ่งกราฟเส้นที่ได้จะแสดงถึงรูปแบบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด แต่อย่างไรก็ตามควรจะมีการศึกษาพบทวนสถานะที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมกับวัสดุอุปกรณ์ที่มีในห้องปฏิบัติการนั้นๆ และแม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการตรวจวัดในผู้ป่วย แต่ผลการศึกษาที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดตั้งการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยวิธีนับจำนวนเกล็ดเลือดเดี่ยวในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีงบประมาณสำหรับการจัดซื้อเครื่องทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่มีราคาแพงต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนทั่วไปจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณโยธิน โสภิตประดิษฐ์พร ในการประกอบอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Born GVR. Quantitation investigations into the aggregation of blood platelets. *J Physiol (London)* 1962; 162: 67-8.
2. Gaarder A, Jonsen J, Laland J, Helme A, Owern PA. Adenosine diphosphate in red cells as a factor in adhesiveness of human blood platelets. *Nature* 1961; 192: 531-2.
3. Harrison MJ, Emmons PR, Mitchell JR. The effects of white blood cells on platelet aggregation. *Thromb Diath Haemorrh* 1966; 16:105-21.
4. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3: 135-58.
5. Butcher J, Humphrey PP, Hyde JJ, Lumley P, Spurling MW. The evaluation of a new electron counting technique for measurements of platelet aggregation in human whole blood. *Br J Pharmacol* 1980; 70: 160-1.
6. Lumley P, Humphrey PP. A method for quantitating platelet aggregation and analysing drug receptor interactions on platelets in whole blood. *J Pharmacol Methods* 1981; 6: 153-66.
7. Saniabadi AR, Lowe GD, Forbes CD, Prentice CR, Barbenel JCC. Platelet aggregation studies in human whole blood. *Thromb Res* 1983; 30: 625-32.
8. Cheeseman J, Mills SP, Hardisty R. Platelet aggregometry on whole blood: the use of the ELT 8/ds blood cell counter in the investigation of bleeding disorders. *Clin Lab Haematol* 1984; 6: 265-72.
9. Falcon C, Arnout J, Vermeylen J. Platelet aggregation in whole blood studies with a platelet counting technique- methodological aspects and some applications. *Thromb Haemost* 1989; 61: 423-8.
10. Saniabadi AR, Lowe GD, Barbenel JC, Forbes CD. A comparison of spontaneous aggregation in whole blood with platelet rich plasma: additional evidence for the role of ADP. *Thromb Haemost* 1984; 51: 115-8.
11. Saniabadi AR, Lowe GD, Barbenel JC, Fobes CD. Further studies on the role of red blood cells in spontaneous platelet aggregation. *Thromb Res* 1985; 38: 225-32.
12. Thiagarajan P, Wu KK. In vitro assays for evaluating platelet function. In: Gesele P, Page C, Fuster V, Vermeylen J, eds. *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders. Pathophysiology, pharmacology and therapeutics*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 459-70.
13. Kunicki TJ, Orzechowski R, Annis D, Honda Y. Variability of integrin alpha 2 beta 1 activity on human platelets. *Blood* 1993; 82: 2693-703.