

ส่วนผสมน้ำยาป้องกันเลือดแข็งกับน้ำยาด้านเกล็ดเลือดที่เสนอให้ใช้ในการศึกษาการกระตุ้นเกล็ดเลือดตั้งแต่อยูในร่างกาย*

ยุทธนา หมั่นดี¹, สุวรรณ เสมศรี², ธฤต นาคสวัสดิ์¹ และสิงห์คำ ธิมา¹

บทคัดย่อ

การถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดนิยมทำการศึกษาในโรคธาลัสซีเมีย มาลาเรีย และไข้เลือดออก ส่วนผสมของน้ำยาป้องกันเลือดแข็งกับน้ำยาด้านเกล็ดเลือดที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้อย่างสมบูรณ์ มีความจำเป็นในการศึกษาการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดตั้งแต่อยูในร่างกาย เพื่อให้แน่ใจว่าการถูกกระตุ้นนั้นไม่ได้เกิดขึ้นในหลอดทดลองภายหลังการเจาะเก็บเลือด โดยทั่วไปการศึกษาเกล็ดเลือดนิยมใช้ 0.109 M tri-sodium citrate solution เป็นน้ำยาป้องกันเลือดแข็ง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำยาต่อเลือดที่ 1:9 แต่ชนิดและความเข้มข้นของยาด้านเกล็ดเลือดที่เหมาะสมที่จะใช้ผสมในน้ำยาดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาอย่างชัดเจน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของยาด้านเกล็ดเลือดที่เหมาะสม ได้แก่ aspirin, dipyridamole, prostaglandin E2, caffeine, theophylline และ sodium azide โดยใช้ phosphate buffer saline (PBS) pH 7.3 เป็นตัวทำละลาย หลังจากอุ่นตัวอย่างเกล็ดเลือดเข้มข้นจากคนปกติกับน้ำยาด้านเกล็ดเลือดทั้ง 6 ชนิด ในความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ระดับ พบว่า aspirin, caffeine, theophylline และ sodium azide ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายต่ำที่สุดเป็น 8.3, 3.2, 1.7 และ 1.5 mM ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อทดสอบโดย optical platelet aggregometer ที่ใช้ platelet rich plasma (PRP) เป็นตัวทดสอบ และใช้ epinephrine เป็นสารกระตุ้น ในขณะที่ dipyridamole และ prostaglandin E2 ในความเข้มข้นสุดท้ายสูงที่สุดเป็น 0.26 และ 0.38 mM ตามลำดับ ไม่สามารถยับยั้งได้ เมื่อเตรียมส่วนผสมของยาด้านเกล็ดเลือด 4 ชนิด คือ aspirin, caffeine, theophylline และ sodium azide ที่มีความเข้มข้น 83, 32, 17 และ 15 mM ที่ละลายใน 0.109 M tri-sodium citrate solution มาใช้เก็บตัวอย่างเลือดคนปกติ 10 ราย ในอัตราส่วน 1:9 เพื่อทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดใน PRP พบว่าส่วนผสมดังกล่าวสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้อย่างสมบูรณ์ จึงเสนอให้ใช้ส่วนผสมดังกล่าวในการศึกษาการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดตั้งแต่อยูในร่างกายต่อไป

คำสำคัญ: น้ำยาป้องกันเลือดแข็ง • ยาด้านเกล็ดเลือด • การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

บทนำ

เกล็ดเลือด (blood platelets หรือ platelets หรือ thrombocytes) คือ เซลล์ชนิดหนึ่งในเลือด รูปร่างกลมและแบน นูนออกทั้งสองด้าน (biconvex) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-4 μm ย้อมสี Romanowsky ติดสีฟ้าที่ขอบและติดสีม่วงตรงกลาง ในเลือดคนปกติ จะมีเกล็ดเลือดประมาณ $140-440 \times 10^3/\mu\text{l}$ เกล็ด

¹ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

² ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิกและปรสิตวิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10520

* เสนอโดยวาจา ในการประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 26 สมาคมโลหิตวิทยาแห่งประเทศไทย. 14-17 มกราคม 2546. กรุงเทพฯ ๗.

A proposed composition of anti-coagulant and anti-platelet mixture for *in vivo* platelet activation studies*

Yuttana Munde¹, Suwanna Semsri², Tarit Naksawat¹ and Singkome Tima¹

Abstract

Platelet activation is widely studied in thalassemia, malaria and Dengue hemorrhagic fever. Mixture of anti-coagulant and anti-platelet for complete inhibition of *in vitro* platelet aggregation is essential for *in vivo* platelet activation studies. Anti-coagulant used in general platelet study is 0.109 M tri-sodium citrate solution. The optimum ratio of anti-coagulant: blood is 1:9. However the concentration of anti-platelet to be added to the mixture is remained unclear. This study aims to search for suitable anti-platelets such as aspirin, dipyridamole, prostaglandin E₂, caffeine, theophylline and sodium azide (NaN₃), and their optimum concentrations using phosphate buffer saline solution (PBS) pH 7.3 as solvent medium. Platelet aggregation on optical platelet aggregometer was tested after platelet rich plasma (PRP) from a normal person was incubated with each anti-platelet solution in 5 various concentrations and epinephrine was added as an agonist. The results show that either 8.3 mM aspirin, 3.2 mM caffeine, 1.7 mM theophylline or 1.5 mM sodium azide inhibits *in vitro* platelet aggregation completely. Dipyridamole and prostaglandin E₂ could not achieve the complete inhibition at the highest used concentrations. A mixture of 4 anti-platelet drugs, consisted of 83 mM aspirin, 32 mM caffeine, 17 mM theophylline and 15 mM NaN₃ in 0.109 M tri-sodium citrate solution for a blood collection ratio of 1:9, was tested in 10 normal subjects. The mixture had a complete inhibition of *in vitro* platelet aggregation. As a result, this mixture is proposed for *in vivo* platelet aggregation studies in general.

Keyword: anti-coagulant • anti-platelet drug • platelet aggregation

เลือดมีหน้าที่ซ่อมแซมผนังภายในของหลอดเลือด และ ทำหน้าที่อุดบาดแผลเมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือด โดยการเกาะติดกับผนังหลอดเลือดที่ฉีกขาด (adhesion) เปลี่ยนแปลงรูปร่าง (shape change) ไปเป็นทรงกลม และมีก้านยื่นออกมาคล้ายรูปดาว (starlet) ปลอ่ย สารเคมีชนิดต่างๆ ที่สร้างหรือเก็บสะสมไว้ออกมากระตุ้น เกิดเลือดตัวอื่นๆ ให้มาช่วยกันอุดบาดแผล (aggregation) การถูกกระตุ้นถ้าไม่รุนแรง เกิดเลือด จะกลับสู่สภาวะปกติได้ เรียกว่า reversible change

หรือ primary activation แต่ถ้าการถูกกระตุ้นรุนแรง จะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลับสู่สภาวะเดิมได้ เรียกว่า irreversible change หรือ secondary activation เกิดเลือดทำงานร่วมกับระบบการแข็งตัวของเลือด (hemostatic system หรือ blood coagulation) โดยการกระตุ้นซึ่งกันและกันได้ ทำให้สามารถอุดบาดแผล ได้แข็งแรงขึ้น²⁻⁴

การตรวจนับจำนวนหรือการศึกษาการเกาะกลุ่ม ของเกิดเลือด จำเป็นจะต้องใช้สารป้องกันเลือดแข็ง

¹ Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, 50200, Thailand.

² Department of Clinical Microscopy and Parasitology, Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakarn 10540, Thailand.

* Oral presented in The 26th Annual Meeting of The Thai Society of Hematology. January 14-17, 2003. Bangkok, Thailand.

(anti-coagulant) เพื่อให้เลือดยังคงเป็นของเหลว สารป้องกันเลือดแข็งที่นิยมใช้ในการตรวจการแข็งตัวของเลือดและการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด คือ citrate ซึ่งเป็น chelator ที่จับ Ca^{++} ได้พอเหมาะไม่แรงมากนัก²⁻³ ในการศึกษาการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดนอกร่างกาย (*in vitro* platelet activation) การใช้เพียงสารป้องกันเลือดแข็งก็เพียงพอ แต่การศึกษาการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดในร่างกาย (*in vivo* platelet activation) จะไม่เพียงพอ เนื่องจากการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดที่ตรวจพบ อาจจะไม่เกิดขึ้นในร่างกาย แต่เกิดขึ้นในหลอดทดลองภายนอกในร่างกาย โดยปกติเกล็ดเลือดสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยสิ่งแวดล้อมภายนอกในร่างกาย จึงจำเป็นต้องมีน้ำยาที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดผสมลงไปด้วย เช่น aspirin⁵, caffeine⁶, theophylline⁶, dipyridamole⁷, prostaglandin E2⁸ และ sodium azide⁹ เป็นต้น เพื่อให้เลือดไม่แข็งตัวพร้อมกับหยุดการทำงานของเกล็ดเลือดไปพร้อมกัน ดังนั้นเมื่อนำตัวอย่างเลือดนั้นๆ ไปตรวจหาสิ่งต่างๆ ที่ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือด ก็จะสามารถมั่นใจได้ว่าค่าที่ได้นั้นๆ เป็นค่าการตรวจวัดที่ได้มาจากการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดภายในร่างกายจริงๆ เพราะเกล็ดเลือดทั้งหมดถูกยับยั้งการทำงานโดยสิ้นเชิงแล้ว ทันทีที่เลือดถูกเจาะออกมาผสมกับส่วนผสมของน้ำยาป้องกันเลือดแข็งกับน้ำยาด้านเกล็ดเลือดดังกล่าว

การศึกษาการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดภายในร่างกาย มีเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ ทั้งในคนปกติและในผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น โรคธาลัสซีเมีย¹⁰ มาลาเรีย¹¹ และไข้เลือดออก¹² เป็นต้น การตรวจวัดการทำงานของเกล็ดเลือดมีหลายแบบ เช่น การกระตุ้นเกล็ดเลือดภายนอกร่างกายให้เกาะกลุ่มโดยใช้สารเคมีที่กระตุ้นเกล็ดเลือดได้ ที่เรียกว่า agonists เช่น adenosine di-phosphate (ADP), collagen, epinephrin และ ristocetin เป็นต้น แล้วตรวจวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ที่เรียกว่า platelet aggregation test โดยใช้เครื่อง platelet aggregometer ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่า

เกล็ดเลือดที่อยู่เป็นอิสระจะล่องลอยอยู่ในพลาสมาและบดบังแสง ทำให้แสงส่องผ่านได้น้อย เมื่อเกล็ดเลือดทำงานได้โดยการเกาะกลุ่มกัน การบดบังแสงจะน้อยลง ร้อยละของแสงที่ส่องผ่านได้ก็จะมากขึ้น ซึ่งจะแปรผันโดยตรงกับการเกาะกลุ่มกันที่มากขึ้นของเกล็ดเลือด แต่เมื่อใดที่เกล็ดเลือดไม่ทำงาน ก็จะไม่มีการเกาะกลุ่มกัน การบดบังแสงก็ยังคงเดิม แสงยังคงส่องผ่านได้น้อยหรือได้มากขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น³

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาด้านเกล็ดเลือด ที่จะนำมาผสมกับน้ำยาป้องกันเลือดแข็งที่นิยมใช้กันอยู่ ได้แก่ 0.109 M (3.8% W/V) tri-sodium citrate³ เพื่อให้ได้น้ำยาสำเร็จรูปที่สามารถเป็นได้ทั้งน้ำยาป้องกันเลือดแข็ง (anti-coagulant) และน้ำยาที่ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด (anti-platelet drugs) สำหรับใช้ในการศึกษาการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดตั้งแตอยู่ในร่างกาย

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด

ใช้ตัวอย่างเลือดจากคนปกติจำนวน 1 ราย ในการตรวจหาชนิดและความเข้มข้นของ anti-platelet drugs ที่เหมาะสม หลังจากได้ผลการทดลองดังกล่าวแล้ว จึงเตรียมน้ำยาสำเร็จรูปที่เป็น ส่วนผสมของน้ำยาป้องกันเลือดแข็งกับน้ำยาด้านเกล็ดเลือด (anti-platelet and anti-coagulant mixture; APAC mix) แล้วทดสอบว่าสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้อย่างสมบูรณ์หรือไม่ ในเลือดตัวอย่างจากคนปกติ 10 ราย ผู้บริจาคเลือดทั้ง 11 รายนี้ เป็นนักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ยินดีและยินยอมบริจาคเลือดเพื่อการศึกษาครั้งนี้ โดยการลงนามในใบยินยอมทุกราย

2. น้ำยา

Phosphate buffer saline solution pH 7.3 ละลาย NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.15 g และ

KH_2PO_4 0.2 g ในน้ำกลั่น 1 l ปรับ pH ให้ได้ 7.3

Aspirin solution ละลาย aspirin (Bayer, Germany) ขนาด 500 mg/tablet จำนวน 2 tablets ใน 25 ml PBS pH 7.3 จะได้ aspirin solution ความเข้มข้น 40 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบ 3.32 mM โดยคำนวณจากปริมาตรสุดท้าย 600 μl ที่ประกอบด้วย PRP 400 μl , anti-platelet solution 150 μl และเติม epinephrine 50 μl)

Dipyridamole solution ละลาย dipyridamole (Cytotec, Italy) ขนาด 75 mg/tablet จำนวน 12 tablets ใน 22.5 ml PBS pH 7.3 จะได้ dipyridamole solution ความเข้มข้น 40 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบ 0.26 mM)

Prostaglandin E2 solution ละลาย prostaglandin E2 (Boeringer Ingelheim, Germany) ขนาด 200 mg/tablet จำนวน 5 tablets ใน 25 mL PBS pH 7.3 จะได้ prostaglandin E2 solution ความเข้มข้น 40 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบ 0.38 mM)

Caffeine solution ละลาย caffeine (Maxway, USA) 1.0 g ใน 25 ml PBS pH 7.3 จะได้ caffeine solution ความเข้มข้น 40 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบ 1.28 mM)

Theophylline solution ละลาย theophylline (Sigma, USA.) 1.0 g ใน 25 ml PBS pH 7.3 จะได้ theophylline solution ความเข้มข้น 40 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบ 0.68 mM)

Sodium azide solution ละลาย sodium azide (Reidel-Dhaen, Germany) 1.0 g ใน 25 ml PBS pH 7.3 จะได้ sodium azide solution ความเข้มข้น 40 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในการทดสอบ 0.60 mM)

Tri-sodium citrate solution (0.109 M หรือ 3.8% W/V) ละลาย 3.8 g ของ tri-sodium citrate $5.5 \text{ H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 100 ml

Anti-platelet and anti-coagulant (APAC)

mixture ละลาย aspirin ขนาด 500 mg/tablet จำนวน 2 tablets, caffeine 1.0 g, theophylline 1.0 g และ sodium azide 0.1 g ใน 10 ml ของ 0.109 M (3.8% W/V) tri-sodium citrate solution

3. วิธีการตรวจ

หาชนิดและความเข้มข้นของ anti-platelet drugs ที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้อย่างสมบูรณ์ โดยทำการตรวจด้วยวิธี optical platelet aggregation test ที่ใช้ PRP aggregometer รุ่น Aggrecoorder II (PA-3220) วิธีการโดยย่อ ดังนี้ เก็บเลือดตัวอย่าง 1 ราย ใน 0.109 M tri-sodium citrate solution อัตราส่วน น้ำยา : เลือด เท่ากับ 1:9 ผสมเบาๆ ปั่นที่ 180 x g นาน 20 นาที ที่ 20 °C แยกเก็บ PRP นำ packed red cells (PRC) ไปปั่นที่ 1,000 x g นาน 20 นาที ที่ 20 °C แยกเก็บ platelet poor plasma (PPP) แล้วนำไปใช้ปรับ PRP ให้มีเกล็ดเลือด $3.0 \times 10^5 /\mu\text{l}$ ใส่ PRP ที่ปรับแล้ว 400 μl ลงใน cuvette อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 1 นาที ใส่ stirrer piece ปรับความเร็วไว้ที่ 1,000 rpm เติม anti-platelet solution ชนิดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ กัน 5 ระดับ (2.5, 5.0, 10, 20, 40 mg/ml ของ aspirin, dipyridamole, prostaglandin E2, caffeine, theophylline และ sodium azide ตามลำดับ) ปริมาตร 150 μl ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยานาน 5 นาที เติม 50 μl ของ 1 mg/ml epinephrine (Atlantic Labs, USA.) วัด % aggregation ภายในระยะเวลา 5 นาที เปรียบเทียบกับ PBS control ซึ่งใช้ PBS แทนน้ำยาด้านเกล็ดเลือด บันทึกผลเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

ทดสอบประสิทธิภาพของ APAC ในการยับยั้งเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองอย่างสมบูรณ์ วิธีการโดยย่อ มีดังนี้ เก็บเลือดตัวอย่าง 10 ราย ใน APAC อัตราส่วน น้ำยา : เลือด เท่ากับ 1:9 ผสมเบาๆ เตรียม PRP, PPP และการตรวจหา % aggregation ทำโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้ว แต่จะไม่มี

การเติม anti-platelet solution เปลี่ยนเป็นใช้ PBS เติมลงไป 150 µl แทน เพื่อให้ปริมาตรรวมของการทดสอบเท่ากัน เปรียบเทียบ % aggregation กับ control ที่ได้จากการเก็บเลือดตัวอย่างเดียวกันใน 0.109 M tri-sodium citrate solution บันทึกผลเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

ผลการศึกษา

ความเข้มข้นน้อยที่สุดของ aspirin, caffeine, theophylline และ sodium azide ที่ 10 mg/ml เมื่อใช้ 150 µl ในปริมาตรทั้งหมด 600 µl หรือที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 8.3, 3.2, 1.7 และ 1.5 mM ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ ผล % aggregation ของ PRP ที่ทำปฏิกิริยากับ anti-platelet drugs ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ แสดงไว้ในตารางที่ 1 สำหรับผล % aggregation ของ PRP ที่ทำปฏิกิริยากับ aspirin solution ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

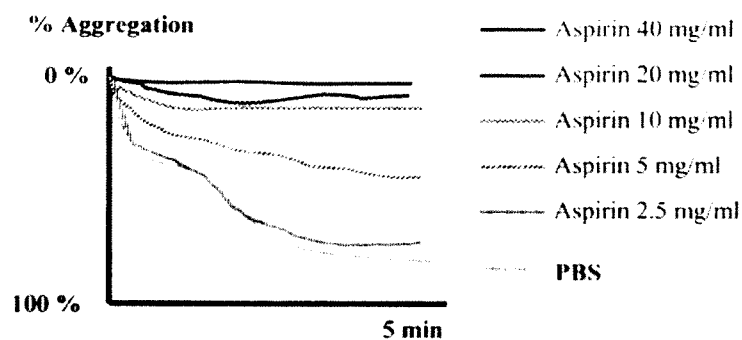
แสดงไว้ในรูปที่ 1 และผล % aggregation ของ PRP ที่ทำปฏิกิริยากับ anti-platelet drugs ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml แสดงไว้ในรูปที่ 2 (กลุ่มบน) ในขณะที่ dipyridamole และ prostaglandin E2 ที่ความเข้มข้นมากที่สุด 40 mg/ml เมื่อใช้ 150 µl ในปริมาตรทั้งหมด 600 µl หรือที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.26 และ 0.38 mM ตามลำดับ พบว่ายังไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และรูปที่ 2 (กลุ่มล่าง)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ APAC พบว่าสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ได้อย่างสมบูรณ์ในเลือดตัวอย่างที่ได้จากคนปกติทั้ง 10 ราย เมื่อเปรียบเทียบกับเลือดของคนเดียวกันที่เก็บใน 0.109 M Tri-sodium citrate solution ที่ให้ผล % platelet aggregation สูง เหมือนปกติทุกราย ดังแสดงตัวอย่าง 1 ราย ไว้ในรูปที่ 3

ตารางที่ 1 ผลร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุด (% maximum aggregation) ของน้ำยาดันเกล็ดเลือด ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ

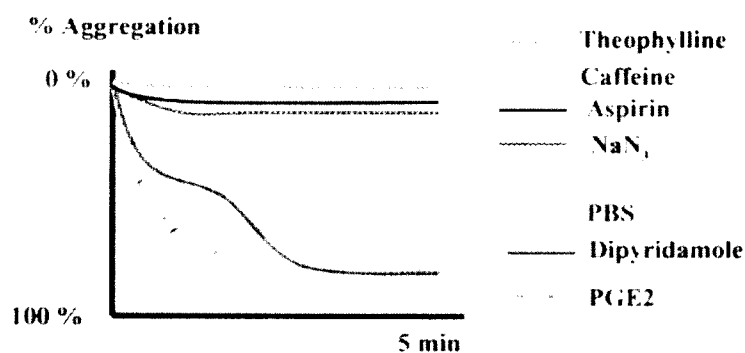
Anti-platelet Solution	% maximum aggregation ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
	2.5 mg/ml	5.0 mg/ml	10.0 mg/ml	20.0 mg/ml	40.0 mg/ml
Aspirin	80.2	39.7	5.6	4.7	4.4
Dipyridamole	73.7	75.8	77.2	78.3	79.1
Prostaglandin E2	75.0	69.7	75.7	78.4	77.8
Caffeine	77.2	38.9	6.7	6.1	5.7
Theophylline	76.8	49.3	6.8	5.2	5.3
Sodium Azide (NaN ₃)	79.2	59.3	6.5	5.1	5.8

Platelet rich plasma optical aggregation test, n = 1,
PRP = 400 µl, anti-platelet solution 150 µl, epinephrine 50 µl,
PBS control = 82.3 % aggregation



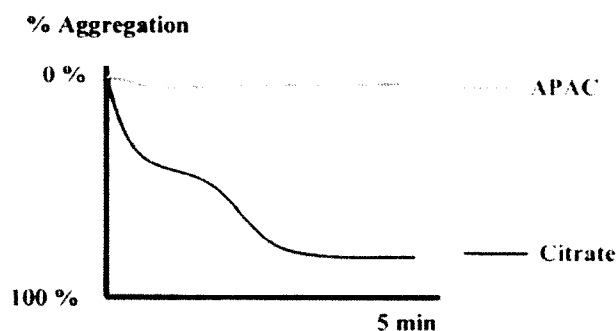
PRP 400 μ l, Aspirin solution 150 μ l & Epinephrine 50 μ l

รูปที่ 1 ตัวอย่าง platelet aggregation curve ของ aspirin solution ที่ความเข้มข้นต่างๆ (n = 1)



PRP 400 μ l, Anti-platelet solution 150 μ l & Epinephrine 50 μ l

รูปที่ 2 ตัวอย่าง platelet aggregation curve ของน้ำยาด้านเกล็ดเลือด ชนิดต่างๆ (น้ำยาด้านเกล็ดเลือดที่ความเข้มข้น 10 mg/ml ยกเว้น dipyridamole และ prostaglandin E2 = 40 mg/ml, n = 1)



PRP 400 μ l, PBS 150 μ l & Epinephrine 50 μ l

รูปที่ 3 ตัวอย่าง platelet aggregation curve ของ PRP ที่เตรียมจากเลือดที่ใช้ anti-platelet anti-coagulant mixture (APAC) และ citrate ของ

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการที่ aspirin, caffeine, theophylline และ sodium azide ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 8.3, 3.2, 1.7 และ 1.5 mM ตามลำดับ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อทดสอบโดย optical platelet aggregometer ที่ใช้ platelet rich plasma (PRP) เป็นตัวทดสอบ โดยใช้ epinephrine ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml เป็นสารกระตุ้น เนื่องจาก aspirin เป็น cyclo-oxygenase inhibitor⁵ จึงสามารถยับยั้งการสร้าง thromboxane A₂ (TXA₂) ได้อย่างถาวร เมื่อเกล็ดเลือดสัมผัสกับ aspirin แล้ว release reaction ที่ต้องใช้ cyclo-oxygenase activity จะถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ตลอดอายุไซ ซึ่งเป็น permanent inhibition ที่เกล็ดเลือดจะไม่สามารถมี secondary aggregation ได้อีก ส่วน caffeine⁶ และ theophylline⁶ ทั้งคู่มีโครงสร้างของโมเลกุลคล้ายกันมาก และมีฤทธิ์เป็น adenosine receptor antagonists เหมือนกัน โดยป้องกันไม่ให้เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งเป็น natural agonist ที่สำคัญที่สุดในร่างกาย ในขณะที่ dipyridamole⁷ ที่ปกติจะสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้ง adenosine uptake ได้ และ prostaglandin E₂⁸ (PGE₂) ก็เช่นเดียวกันที่สามารถเป็น platelet inhibitor และ natural vasodilator ได้ แต่ในความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษานี้ ยังไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ สำหรับ sodium azide⁹ มีผลยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้เช่นกัน โดยอาศัยคุณสมบัติ cytotoxic effect ของสารชนิดนี้

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ที่ใช้ตัวอย่างทดสอบเพียงรายเดียวอาจ จะไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัด ถึงผลการยับยั้งที่แท้จริง และอาจเกิดความผันแปรของผลการทดลองได้ ถ้านำไปทำในตัวอย่างที่มีจำนวนที่มากขึ้นดังจะเห็นได้จากการที่ dipyridamole และ prostaglandin E₂ ในขนาดความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ใช้ทดสอบนี้ หรือที่ความเข้มข้นสุดท้าย

ที่ 0.26 และ 0.38 mM ตามลำดับ ยังไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดของตัวอย่างเลือดรายนี้ได้ แต่ก็นำไปทำการทดสอบกับตัวอย่างเลือดรายอื่นๆ อาจจะมีผลที่ยับยั้งได้ นอกจากนี้จากการสังเกตผลของ prostaglandin E₂ ที่ดูเสมือนว่าการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมีมากกว่า PBS control เล็กน้อย ซึ่งน่าจะเกิดจากความแปรปรวน (variation) ของการทดลองมากกว่า ไม่น่าจะเกิดจากการกระตุ้นที่แท้จริง เนื่องจาก prostaglandin E₂ นั้น มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด แต่ในความเข้มข้นที่ใช้นี้อาจจะน้อยเกินไป จึงไม่สามารถยับยั้งได้ ดังนั้นจึงควรจะได้มีการทำการศึกษาต่อไปถึงความผันแปรในระหว่างตัวอย่างที่ใช้ทดลอง โดยใช้ตัวอย่างที่มากกว่า 1 ราย เพื่อผลการทดลองที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อรวบรวมเอาแต่ anti-platelet drugs ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ให้ผลยับยั้งอย่างสมบูรณ์ มาผสมรวมกันในสารละลายที่เป็น anti-coagulant จึงได้ anti-platelet/anti-coagulant (APAC) mixture ที่มีคุณสมบัติครบถ้วนตามต้องการ คือ ป้องกันการแข็งตัวของเลือดได้และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากกลไกในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของ anti-platelet drug แต่ละชนิดที่ศึกษานี้แตกต่างกัน การใช้ทั้ง 4 ชนิดผสมรวมกันจึงสามารถสร้างความมั่นใจได้ว่า จะสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างครบถ้วนและสมบูรณ์ ทันทีที่ผสมเลือดกับน้ำยา APAC นี้ เพื่อให้การนำตัวอย่างเกล็ดเลือดนั้นๆ ไปทำการศึกษาการถูกกระตุ้นตั้งแต่อยู่นานในร่างกายต่อไป จะได้ค่าการตรวจต่างๆ เป็นค่าที่สื่อหรือบ่งชี้ถึงค่าอื่นๆ ที่เป็นจริงในร่างกายผู้ป่วย มิได้เกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย หลังจากที่ได้เจาะเลือดออกมาแล้ว เนื่องจากธรรมชาติของเกล็ดเลือดนั้นสามารถถูกกระตุ้นได้ง่าย ในสิ่งแวดล้อมที่อยู่ภายนอกในร่างกาย

นอกจากนี้ การใช้สารกระตุ้นเพียงตัวเดียว (epinephrine 1 mg/ml) ยังเป็นข้อจำกัดของการ

ทดลองนี้ เนื่องจากสารกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดนั้นมีหลายชนิด เช่น ADP, collagen และ ristocetin เป็นต้น การใช้ epinephrine เพียงตัวเดียวทำให้ไม่สามารถจะสรุปได้ว่า APAC นี้จะสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มจากการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นตัวอื่นๆ ดังกล่าวได้ นอกจากจะได้ทำการศึกษาต่อไป โดยใช้สารกระตุ้นหลากหลายชนิดมากขึ้น

การศึกษาที่กำลังวางแผนที่จะดำเนินการต่อไป ได้แก่ การศึกษาหาความเข้มข้นของ anti-platelet drug ที่มีช่วงของความเข้มข้นที่กว้างขึ้น โดยเฉพาะของ dipyridamole และ prostaglandin E2 การใช้ตัวอย่างทดสอบที่มีจำนวนมากขึ้น และการใช้สารกระตุ้นหลากหลายชนิดให้มากยิ่งขึ้นให้ครอบคลุมมากที่สุดโดยเฉพาะสารกระตุ้นที่เป็นที่นิยมใช้ในการศึกษา เช่น ADP, collagen และ ristocetin เป็นต้น เพื่อให้สามารถรวบรวมข้อมูลที่น่าเชื่อถือได้มากยิ่งขึ้น ครอบคลุมมากยิ่งขึ้นซึ่งจะทำให้สามารถนำนัยดังกล่าวไปใช้งานได้จริง

สรุป

Aspirin, caffeine, theophylline และ sodium azide ที่ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 8.3, 3.2, 1.7 และ 1.5 mM ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ จึงเลือกใช้ anti-platelets ทั้ง 4 ชนิดนี้ ผสมรวมกันโดยใช้ sodium azide เป็น preservative ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น 10 เท่า (83, 32, 17 และ 15 mM ของ aspirin, caffeine, theophylline และ sodium azide ตามลำดับ) ในสารละลาย 0.109 M tri-sodium citrate solution ที่มีคุณสมบัติเป็น anti-coagulant ทำให้ได้ anti-platelet anti-coagulant (APAC) mixture ที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อใช้ผสมกับเลือดในอัตราส่วน 1:9 จึงแนะนำให้ใช้ APAC นี้สำหรับการศึกษาการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดตั้งแต่อยู่ในร่างกายเพื่อลดการนำเข้าน้ำยาดังกล่าวจากต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วน จากงบประมาณเงินรายได้ คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี พ.ศ. 2545

เอกสารอ้างอิง

1. Harmening DM. Clinical hematology and fundamental of hemostasis. 3rd. ed. Philadelphia: FA Davis Company, 1997.
2. สุนันท์ จำรูญ, นิพนธ์ กวีธาพล. คู่มือการตรวจชันสูตรทางโลหิตวิทยา. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์การศาสนา, 2529.
3. ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, ธวัช โตสิตารัตน์, ปฐม ปฐมธนพงศ์, มงคล โชติยาภรณ์, ศาคร พรประเสริฐ, ธีญารัตน์ จอมแก้ว. คู่มือปฏิบัติการโลหิตวิทยา. เชียงใหม่: หสน. ส. ทรัพย์การพิมพ์, 2543.
4. Wallach J. Reticulocyte count. In: Interpretation of Diagnostic Test. 7th. ed. New York: A Wolters Kluwer Company, 1998.
5. Capone ML, Tacconelli S, Sciulli MG, et al. Clinical pharmacology of platelet, monocyte, and vascular cyclooxygenase inhibition by naproxen and low-dose aspirin in healthy subjects. Circulation 2004; 109: 1468-71.
6. Biaggioni I, Paul S, Puckett A, Arzubia C. Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. J Pharmacol Exp Ther 1991; 258: 588-93.
7. Kirchmaier CM, Altorjay J, Bellinger O, Breddin HK. Inhibition of induced thrombocyte aggregation in the presence of endothelial cells by dipyridamole. Vasa Suppl 1991; 32: 318-21.
8. Bouayad A, Fouron JC, Hou X, et al. Developmental regulation of prostaglandin E2 synthase in porcine ductus arteriosus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004; 286: R903-9.

9. Hedin HL, Eriksson S, Fowler CJ. Rapid inhibition by sodium azide of the phosphoinositide-mediated calcium response to serotonin stimulation in human platelets: preservation in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274: 472-6.
10. Atichartakarn V, Angchaisuksiri P, Aryurachai K, Chuncharunee S, Thakkinstian A. In vivo platelet activation and hyperaggregation in hemoglobin E/beta-thalassemia: a consequence of splenectomy. *Int J Hematol* 2003; 77: 299-303.
11. Chotivanich K, Sritabai J, Udomsangpetch R, et al. Platelet-induced autoagglutination of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells and disease severity in Thailand. *J Infect Dis* 2004; 189: 1052-5.
12. Garcia S, Morales R, Hunter RF. Dengue fever with thrombocytopenia: studies towards defining vulnerability of bleeding. *Bol Asoc Med P R* 1995; 87: 2-7.