วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

Evidence of platelet activation in the plasma of patients with β-thalassemia major

Yuttana Mundee[1], Suwanna Semsri[2], Singkome Tima[1]

Abstract

In vivo platelet activation is expected to be seen in β-thalassemia major especially in the patients with splenectomy. The degree of such activation can be examined by measuring the levels of platelet activation markers in the plasma using the principle of sandwich enzyme immuno assay (EIA). The aim of this study is to determine the degree of platelet activation in patients with β-thalassemia major in comparison with normal healthy volunteer blood donors. The markers assayed were 2 specific platelet activation markers of α-thromboglobulin or platelet factor 4 (PF4) and β-thromboglobulin (BTG). Plasma samples were obtained from 30 healthy donors and 50 patients with 34 non-splenectomy and 16 splenectomy of Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University between 30/10 to 27/12/2002. The mean ± standard deviation (SD) of plasma levels of PF4 in controls and patients were 61±18 and 88±14 IU/ml ($p<0.05$) and of BTG were 190±51 and 263±41 IU/ml ($p<0.05$) respectively. In non-splenectomized and splenectomized patients the PF4 levels were 86±14 and 93±11 IU/ml and the BTG levels were 256±40 and 279±41 IU/ml ($p<0.05$) respectively. This finding showed a clear evidence of in vivo platelet activation in the plasma of β-thalassemia major and also indicated the higher degree of such activation in splenectomized patients. Therefore a prophylaxis with prescription of low dose aspirin for inactivation of platelets may benefit the patients especially in the prevention of thrombosis and thromboembolism.

Key words: β-Thalassemia • platelet activation • PF4 • BTG

ความผิดปกติทางพันธุกรรม ที่มียีนควบคุมการสร้าง β-globin ผิดปกติไป ทำให้มีการสร้างน้อย ในขณะที่ยีนควบคุมการสร้าง α-globin ปกติดี จึงมีโกลบินชนิดหลังนี้เหลือมากเกิน แล้วไปสะสมอยู่ในเม็ดเลือดแดงและไม่เสถียร เมื่อมีสภาวะ oxidative stress หรือมีเหล็กเกิน[9] จะทำให้เกิดการชำรุดของผนังเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงนั้นๆ แตกออกเป็นส่วนย่อยเล็กๆ (erythrocyte microvesicles) แล้วยังทำให้ PS ซึ่งปกติจะอยู่ด้านในของผนังเม็ดเลือดแดง เผยออกมาอยู่ด้านนอก ทั้งในเม็ดเลือดแดงเอง ส่วนย่อยของเม็ดเลือดแดง และในเกล็ดเลือด

Phosphatidylserine ที่เผยออกสู่ด้านนอกของเซลล์นี้ สามารถกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดได้ทำให้เกิด prothrombinase complex (FVa-FXa-fibrinogen) ที่สามารถย่อย prothrombin ให้เป็น thrombin ได้ ซึ่ง thrombin สามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดได้โดยตรง[10] เม็ดเลือดแดงและส่วนย่อยของเม็ดเลือดแดง รวมทั้งเกล็ดเลือดที่มีผนังเซลล์ชำรุดจะถูกจับกินและย่อยสลาย

[1]Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University
[2]Master of Science student, Department of Clinical Microscopy, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, academic year 2002-03.

*Oral presented in the meeting for 20th Anniversary of Physical Therapy and 25th Anniversary of Medical Technology of Khon Kaen University. March 19-21, 2003. Khon Kaen

ยังเก็บเลือดใน ethylene diamine tetra-acetate di-sodium salt (Na_2EDTA) เพื่อทำการตรวจ complete blood count (CBC) ทุกราย

2. น้ำยา

Asserachrome® PF4 ซึ่งเป็น platelet factor 4 commercial EIA test kit จาก บริษัท Diagnostica Stago, France

Asserachrome® β-TG ซึ่งเป็น β-thromboglobulin commercial EIA test kit จาก บริษัท Diagnostica Stago, France

3. วิธีการตรวจ

ตัวอย่างเลือดใน EDTA ทำการตรวจ CBC โดยเครื่อง blood cell analyzer ของ บริษัท Sysmex, Corp., Japan รุ่น Sysmex KX-21N บันทึกค่าต่างๆ ไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

นำตัวอย่างพลาสมาที่แช่แข็งไว้มาละลายในอุณหภูมิห้องและนำชุดน้ำยาตรวจทั้ง 2 ชนิด คือ PF4 และ BTG ออกมาตั้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ทำการตรวจตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด บันทึกค่าระดับ PF4 และ BTG ไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X}$ ±SD) ของระดับความเข้มข้นของ PF4 และ BTG ในพลาสมา มีหน่วยเป็น International Unit/milliliter (IU/ml) คำนวณหาค่า PF4 และ BTG เฉลี่ยต่อหนึ่งล้านเกล็ดเลือด โดยการนำจำนวนเกล็ดเลือดที่มีหน่วยเป็นล้าน (10^6) ในเลือด 1 ml มาหารระดับความเข้มข้นของ PF4 และ BTG ที่มีหน่วยเป็น IU/ml ตามลำดับ เพื่อให้ได้ค่า PF4 และ BTG ต่อหนึ่งล้านเกล็ดเลือด (IU/10^6 Plt) ตามลำดับ บันทึกไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป การคำนวณทางสถิติใช้แบบ parametric analysis เนื่องจากค่าทั้ง 4 parameters ดังกล่าวมีการกระจายตัวแบบปกติ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม ใช้ unpaired Student t-test บนโปรแกรม SPSS รุ่นที่ 10.0 บนคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล กำหนดค่าความมีนัยสำคัญไว้ที่ $p<0.05$ (95% confidential limit)

ผลการศึกษา

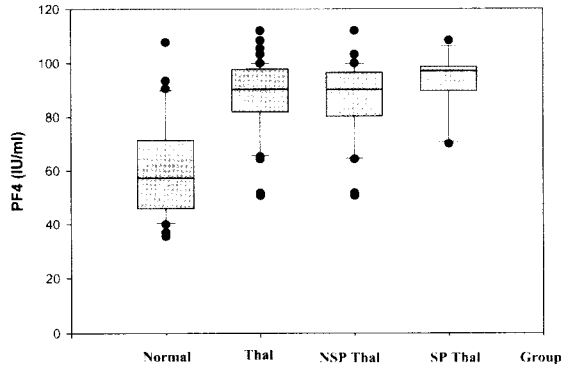
ข้อมูลทางโลหิตวิทยาของคนปกติ (n=30) และของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (n=50) ทั้งผู้ป่วยที่ยังไม่ได้ตัดม้าม (n=34) และตัดม้ามแล้ว (n=16) แสดงไว้ในตารางที่ 1

ค่าระดับ PF4 (IU/ml), PF4 (IU/10^6plt), BTG (IU/ml) และ BTG (IU/10^6plt) ในคนปกติ (n=30) คือ 61±18, 0.26±0.56, 190±51 และ 0.82±0.29 ตามลำดับ ในผู้ป่วย (n=50) คือ 88±14, 0.28±0.14, 263±41 และ 0.83±0.41 ตามลำดับ ในผู้ป่วยที่ยังไม่ได้ตัดม้าม (n=34) คือ 86±14, 0.32±0.14, 256±40 และ 0.95±0.42 ตามลำดับ ในผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้ว (n=16) คือ 93±11, 0.18±0.22, 279±41 และ 0.55±0.20 ตามลำดับ แสดงไว้ในรูปที่ 1-4

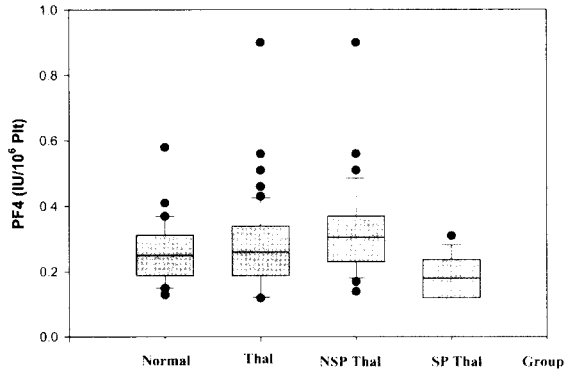
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากข้อมูลทางโลหิตวิทยาที่แสดงในตารางที่ 1 พบว่าผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงในการศึกษานี้ มี microcytic hypochromic anemia จากการที่พบ RBC, Hb, Hct, MCH และ MCHC ต่ำกว่าคนปกติ ($p<0.05$) บ่งชี้การมีสภาวะโลหิตจาง ประกอบกับการมี MCV ต่ำกว่าคนปกติ ($p<0.05$) บ่งชี้การมีเม็ดเลือดแดงขนาดเล็ก การพบค่า white blood cell และ platelet count สูงกว่าคนปกติ ($p<0.05$) บ่งชี้การมีการติดเชื้อเรื้อรังและมีการสร้างเกล็ดเลือดมากกว่าปกติตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้[17-18]

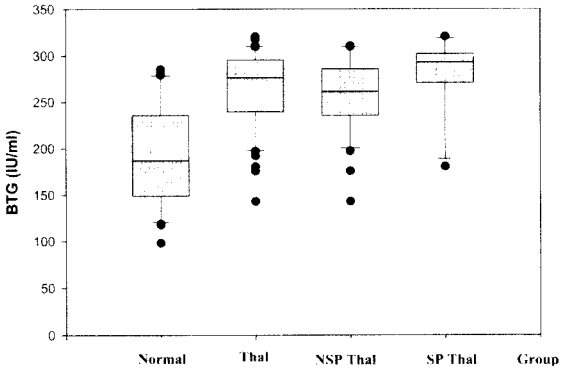
ระดับความเข้มข้นของ PF4 และ BTG ในพลาสมาของผู้ป่วยสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงว่ามีการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดในร่างกายผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้[4-7] แต่พบว่ามีเพียงระดับของ BTG เท่านั้น ที่ผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้วมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ยังไม่ได้



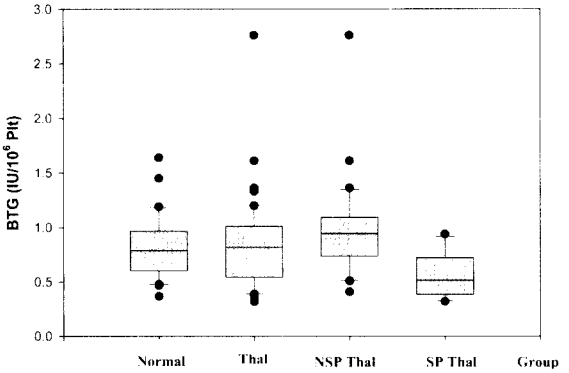
รูปที่ 1 ระดับความเข้มข้นของพลาสมา Platelet Factor 4 (IU/ml) (Normal, n=30; Thal= β-Thalassemia, n=50; NSP=Non-splenectomy, n=34 และ SP=Splenectomy, n=16; Normal vs Thal, $p<0.05$ และ NSP vs SP, $p>0.05$)



รูปที่ 2 ระดับความเข้มข้นของพลาสมา Platelet Factor 4 ต่อหนึ่งล้านเกล็ดเลือด ($IU/10^6$ Plt) (Normal, n=30; Thal=β-Thalassemia, n=50; NSP=Non-splenectomy, n=34 และ SP=Splenectomy, n=16; Normal vs Thal, $p>0.05$ และ NSP vs SP, $p<0.05$)



รูปที่ 3 ระดับความเข้มข้นของพลาสมา β-thromboglobulin (IU/ml) (Normal, n=30; Thal=β-Thalassemia, n=50; NSP=Non-splenectomy, n=34 และ SP= Splenectomy, n=16; Normal vs Thal, $p<0.05$ และ NSP vs SP, $p<0.05$)



รูปที่ 4 ระดับความเข้มข้นของพลาสมา β-thromboglobulin ต่อหนึ่งล้านเกล็ดเลือด (IU/106 Plt) (Normal, n=30; Thal=β-Thalassemia, n=50; NSP=Non-splenectomy, n=34 และ SP= Splenectomy, n=16; Normal vs Thal, $p>0.05$ และ NSP vs SP, $p<0.05$)

พลาสมาของผู้ป่วยนั้น เป็นผลมาจากการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดตั้งแต่อยู่ในร่างกายจริง ไม่ได้เกิดจากการถูกกระตุ้นนอกร่างกายในหลอดทดลอง

จากการที่ม้ามมีหน้าที่กำจัดเซลล์เม็ดเลือดที่ผิดปกติ ซึ่งรวมถึงเกล็ดเลือดที่ผิดปกติด้วย เมื่อม้ามถูกตัดออกไป จึงทำให้เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นแล้วยังคงอยู่ในกระแสเลือดต่อไป ไม่มีม้ามมาคอยดักจับทำลาย นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้วยังมีระดับเกล็ดเลือดสูงกว่าผู้ป่วยที่ยังไม่ได้ตัดม้ามอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เนื่องจากม้ามทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บรักษาเกล็ดเลือดไว้ประมาณ 1 ใน 3 เมื่อไม่มีม้าม เกล็ดเลือดจะถูกปล่อยออกมาอยู่ในกระแสเลือดทั้งหมด เมื่อมีจำนวนเกล็ดเลือดมาก โอกาสที่จะถูกกระตุ้นจึงมีมากตามไปด้วย[19-20]

6. Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, et al. Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. Blood 1998;91:3044-51.
7. Eldor A, Maclouf J, Lellouche F, Ben-Yashar V, et al. A chronic hypercoagulable state and life-long platelet activation in beta thalassemia major. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1993;24(Suppl 1):92-5.
8. Shebl SS, el-Sharkawy HM, el-Fadaly NH. Haemostatic disorders in nonsplenectomized and splenectomized thalassaemic children. East Mediterr Health J 1999;5:1171-7.
9. Pasin M, Yavuzer S, Tekin M, Akar N, Violi F. Oxygen free radical-dependent increased platelet function in beta-thalassemia major patients. Thromb Res 1998;92:283-6.
10. Eldor A, Rachmilewitz EA. The hypercoagulable state in thalassemia. Blood 2002;99:36-43.
11. Moratelli S, De-Sanctis V, Gemmati D, et al. Thrombotic risk in thalassemic patients. J Pediatr Endocrinol Metab 1998;11(Suppl): 3915-21.
12. Pereira J, Palomo I, Ocqueteau M, Soto M, Aranda E, Mezzano D. Platelet aging in vivo is associated with loss of membrane phospholipid asymmetry. Thromb Haemost 1999;82:1318-21.
13. Bunyaratvej A, Komanasin N, Sriurairatana S, Fucharoen S. Morphological assessment of platelet activation in thalassemia. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;23 (Suppl 2):60-4.
14. Ruf A, Pick M, Deutsch V, et al. In-vivo platelet activation correlates with red cell anionic phospholipid exposure in patients with beta-thalassaemia major. Br J Haematol 1997;98:51-6.
15. Opartkiattikul N, Funahara Y, Hijikata-Okunomiya A, Yamaguchi N, Fucharoen S, Talalak P. Detection of PF3 availability in whole blood from volunteers and beta-thalassemia/HbE patients: a promising method for prediction of thrombotic tendency. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;23(Suppl 2):52-9.
16. Timan IS, Funahara Y, Setiabudy R, Latu J, Silman E. PF3 activity in normal subjects and beta-thalassemia trait. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1993;24(Suppl 1):216-8.
17. Lafferty JD, Crowther MA, Ali MA, Levine M. The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. Am J Clin Pathol 1996;106:201-5.
18. d'Onofrio G, Zini G, Ricerca BM, Mancini S, Mango G. Automated measurement of red blood cell microcytosis and hypochromia in iron deficiency and beta-thalassemia trait. Arch Pathol Lab Med 1992;116:84-9.
19. 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.
20. Atichartakarn V, Likittanasombat K, Chuncharunee S, et al. Pulmonary arterial hypertension in previously splenectomized patients with beta-thalassemic disorders. Int J Hematol 2003;78:139-45.
21. Mundee Y, Semsri S, Naksawat T, Tima S. A proposed composition of anti-coagulant and anti-platelet mixture for in vivo platelet activation studies. Bull Med Tech Physic Thera KKU 2005;16 (in press).
22. Opartkiattikul N, Funahara Y, Fucharoen S, Talalak P. Increase in spontaneous platelet aggregation in beta-thalassemia/hemoglobin E disease: a consequence of splenectomy. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;23(Suppl 2):36-41.
23. Laosombat V, Wongchanchailert M, Kenpitak K, Wisitpongpon C. Spontaneous platelet aggregation in thalassemic children and adolescents. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;23(Suppl 2):42-6.