

Biochemistry

of drug-dependent platelet autoantigens

■ ปริยานาถ วงศ์จันทร์¹

¹ แผนกวิชาวิทยาศาสตร์การบริการโลหิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์

คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้รับผิดชอบบทความ

บทนำ

ภาวะเกล็ดเลือดต่ำมักพบได้บ่อยและสัมพันธ์กับการรักษาด้วยยา เรียกว่าภาวะเกล็ดเลือดต่ำที่มีสาเหตุหรือเกี่ยวข้องกับการใช้ยา ว่า drug-dependent thrombocytopenia (DDT) พยาธิ สรีรวิทยาเป็นได้ทั้งแบบ immune และ non-immune mechanism โดยทั่วไปแล้วพยาธิสภาพจะหายไปเองหลังหยุดยา กลไก ของพยาธิสภาพเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของยาในกระแสเลือด แอนติบอดี และเกล็ดเลือด ปฏิกิริยาดังกล่าว มีลักษณะที่เป็น *in vivo* เท่านั้น พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นคือมีการทำลายเกล็ดเลือดระดับเกล็ดเลือดลดลง (thrombocytopenia) และมีเลือดออกผิดปกติ เนื่องจากกระบวนการห้ามเลือดทำไม่ได้หรือไม่สมบูรณ์

Drug capable of causing immunologically mediated thrombocytopenia

Mechanism of action

ตัวอย่างของยาที่มีผลทำให้เกิดเกล็ดเลือดต่ำโดยกลไกแบบ non-immune ได้แก่ ยาที่ใช้ในการรักษามะเร็งและยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ในการกำจัดเกล็ดเลือดในกระแสโลหิตเช่น ristocetin¹ ในทางตรงข้าม ยาที่มีผลทำให้เกิดเกล็ดเลือดต่ำโดยกลไกแบบ immune-mediate มักเป็นยาที่มีผลกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีโดยตรง ลักษณะของพยาธิสรีรวิทยาของ DDT แบ่งออกเป็น 2 ทาง² คือ

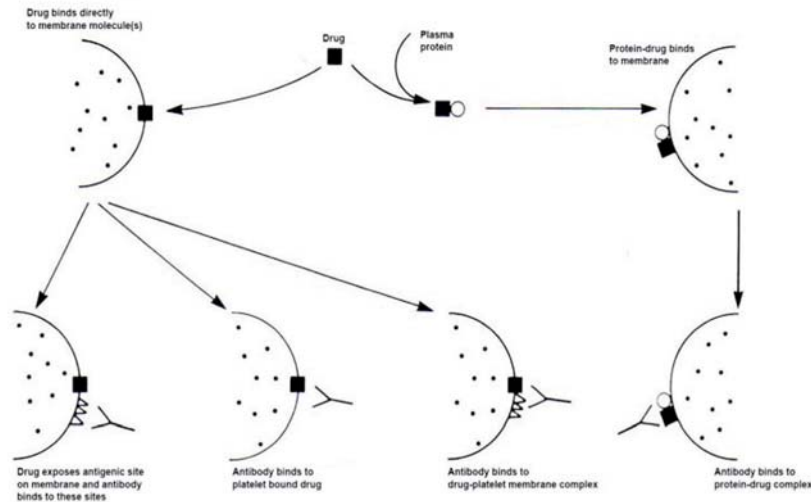
1. โมเลกุลยาเข้าจับกับโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีได้ 4 ลักษณะ ดังนี้ (รูปที่ 1)

- 1.1 โมเลกุลยาที่เข้าจับบนผิวเกล็ดเลือดช่วยเผยแอนติเจนบนผิวเกล็ดเลือด เมื่อร่างกายสร้างแอนติบอดีจะเข้าจับกับแอนติเจนดังกล่าวทำให้เกล็ดเลือดถูกทำลายในที่สุด
- 1.2 โมเลกุลยาจับโดยตรงบนผิวเกล็ดเลือด แอนติบอดีต่อยาสามารถเข้าจับโมเลกุลยาและเกิดการทำลายเกล็ดเลือดผ่านโมเลกุลยา

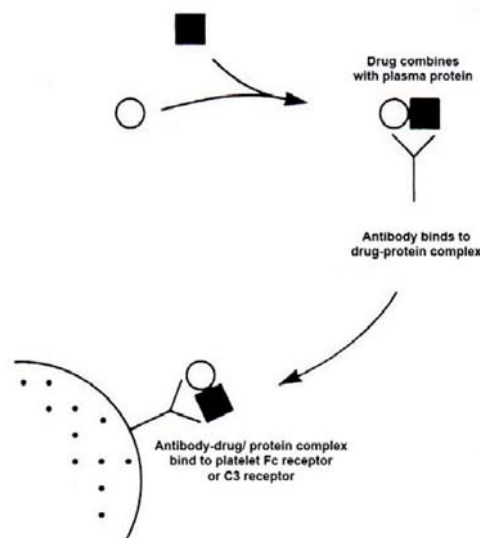
1.3 โมเลกุลยาจับกับโมเลกุลใดๆ บนผิวเกล็ดเลือดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งเป็นโมเลกุลใหม่ กระตุ้นร่างกายให้สร้างแอนติบอดีขึ้น และเกิดการทำลายเกล็ดเลือด

1.4 โมเลกุลยาจับกับโปรตีนในกระแสเลือดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนเข้าจับบนผิวเกล็ดเลือด แอนติบอดีต่อยาเข้าทำลายสารประกอบเชิงซ้อน และทำลายเกล็ดเลือดตามมา

2. โมเลกุลยาเข้าจับกับโปรตีนในกระแสเลือดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอม เกิดการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีเข้าจับโดยตรง จากนั้นคอมเพล็กซ์ระหว่างแอนติบอดีและสารประกอบเชิงซ้อน จะถูกตรึงไว้บนผิวเกล็ดเลือดผ่าน Fc receptor ซึ่งมีอยู่บนผิวเกล็ดเลือดเมื่อผ่านเข้าสู่ระบบ RE เซลล์ในระบบจะทำหน้าที่กำจัดทำให้ระดับเกล็ดเลือดต่ำลง (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ลักษณะของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของยากับโมเลกุลใดๆ และการทำลายเกล็ดเลือดผ่าน Fab (รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)



รูปที่ 2 ลักษณะของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของยากับโมเลกุลใดๆ และการทำลายเกล็ดเลือดผ่าน Fc receptor บนผิวเกล็ดเลือด (รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)

อาการทางคลินิก

โดยทั่วไปจะไม่มีโอกาสทราบว่าคุณคนใดๆ มีโอกาสเสี่ยงต่อการได้รับยาใดแล้วส่งผลให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ กล่าวได้ว่าไม่สามารถคาดเดาได้ ยกเว้นในบางกรณี เช่น การได้รับยาประเภทเข้าทอง (gold salts) หรือบุคคลที่มี HLA-DR3 โอกาสของความเสียหายไม่แตกต่างกันระหว่างเพศ หรือ อายุ³ ดังนั้นผู้ป่วยที่มีประวัติเกล็ดเลือดต่ำเมื่อได้รับยา (drug-induced thrombocytopenia, DITP) จึงต้องได้รับการระมัดระวังเป็นกรณีพิเศษว่าไม่ว่าจะเป็นชนิดรับประทาน ฉีด หรือแม้แต่ยาที่ใช้เฉพาะที่ เพราะผู้ที่เคยมีประวัติดังกล่าว หากได้รับยาซ้ำอาจ

เกิดอาการทางคลินิกภายใน 24 ชั่วโมง ยกเว้นยาประเภทเข้าทองที่มักทำให้เกิดอาการทางคลินิกได้ช้ากว่า คือ เป็นเวลาหลายเดือน ซึ่งทำให้บางครั้งไม่สามารถติดตามได้ว่าอาการดังกล่าวเกิดจากสาเหตุใด

ทั่วไปแล้วอาการทางคลินิกที่พบคือหน้าแดง หนาวสั่นมีจุดเลือดออก ในบางรายที่มีอาการมาก จะพบมีเลือดออกภายในช่องปาก ทางเดินอาหารและทางเดินปัสสาวะ ภายในระยะเวลา 3-12 ชั่วโมงหลังรับยา อาการเลือดออกหายไปได้เองในหลายวันถัดมา แต่บางกรณีอาจนานถึง 10-14 วันก็ได้

พลตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เกล็ดเลือดต่ำถึงต่ำมาก (1,000-10,000/cu.mm) พบ megakaryocytes ในฟิล์มเลือดและมักพบมีการทำลายเม็ดเลือดแดง และ/หรือเม็ดเลือดขาวร่วมด้วย โดยมีสาเหตุจากแอนติบอดีต่อยามีมากกว่าหนึ่งชนิด⁴ หากมีเทคนิคการตรวจพิเศษจะสามารถตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดต่อยาในกระแสเลือดหรือตรวจวัดความผิดปกติในการทำงานของเกล็ดเลือดในภาวะที่มีซีรัมของผู้ป่วยร่วมด้วย

นับถึงปัจจุบันมียามากกว่า 50 ชนิด (ตารางที่ 1) ที่ได้รับการพิสูจน์และยืนยันว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำได้ แต่เนื่องจากยาที่พบเป็นปัญหามากที่สุด และมีการศึกษามากที่สุดมีไม่กี่ชนิด จึงขอนำมาเป็นตัวอย่างของการศึกษาและวิเคราะห์จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ Quinine และ stereoisomer ของ Quinine คือ Quinidine และชนิดที่สามคือ heparin โดยเน้นในเรื่องกลไกของการที่ยากระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและไกลโคโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

Quinine/Quinidine drug-dependent thrombocytopenia คุณสมบัติทั่วไป

แอนติบอดีจำเพาะต่อ Quinine / Quinidine ส่วนใหญ่เป็นชนิด IgG₁ และมีปริมาณมากถึง 25 µg/ml ของพลาสมา⁴ ที่พบในแบบอื่นก็มีบ้างแต่น้อย คือเป็นชนิด IgG₃ และ IgM⁵

อาการทางคลินิกเกิดขึ้นแบบทันทีที่ได้รับยา แม้ว่าไม่เคยมีประวัติการได้รับยามาก่อนก็ตาม อาการแสดงออกคือ purpura, bruising และ mucosal bleeding การตรวจทางห้องปฏิบัติการพบเกล็ดเลือดต่ำอย่างรุนแรง (10,000-20,000/µL)⁶

การวินิจฉัยภาวะ drug-dependent thrombocytopenia อาศัยข้อมูลหลัก 4 ประการดังนี้คือ

1. ผู้ป่วยไม่เคยมีระดับเกล็ดเลือดต่ำมาก่อนหรือก่อนการได้รับยานั้น
2. ผู้ป่วยแสดงอาการ (purpura, bruising และ mucosal bleeding) ขณะได้รับยาและอาการหายไปเมื่อหยุดยา
3. ผู้ป่วยไม่แสดงอาการอีกเมื่อหยุดยาไปแล้ว
4. ผู้ป่วยไม่เคยมีประวัติ หรือไม่มีพยาธิสภาพใดๆ ที่สามารถอธิบายภาวะเกล็ดเลือดต่ำ หรืออาการทางคลินิกที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 1 ยาและสารเคมีที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (drug-induced immunologic thrombocytopenia)⁵

Analgesic (non-steroid, anti-inflammatory)
Acetaminophen, antipyrine, aspirin, clinoril, diclofenac, fenoprofen, indomethacin, oxyphenbutazone, phenylbutazone, piroxicam, sodium salicylate, sulindac, tolmetin
Antibacterials
Ampicillin, cephalixin, cephalotin, cephamandole, gentamycin, lincomycin, methicillin, nitrofurantoin, novobiocin, oxytetracyclin, p-aminosalicylate, nalidixic acid, penicillin, pentamidine, rifampicin, streptomycin, sulfasalazine, sulfonamides, tobramycin, trimethoprim, vancomycin
Cinchona alkaloids
Quinidine, quinine
Foods
Beans, citrus fruits
Sedatives, Hypnotics, Anticonvulsants
Allylisopropylacetylurea, allylisopropylbarbiturate, butabarbitalone, carbamazepine, centalun, chloridazepoxide, clonazepam, diazepam, diphenylhydantoin, ethylallylacetylurea, ethylchlorvinyl, ethylphenylhydantoin, imprimine, meprobamate, paramethadione, phenytoin, phthalazinol, primidone, valproate, valproic acid
Sulfonamide derivatives
Acetazolamide, chlorpropamide, chlorthalidone, clopamide, diazoxide, furosemide, glymidine, tolbutamide
Miscellaneous
Allopurinol, α-methyldopa, amiodarone, amrinone, antazoline, arsenical antiluetics, captopril, chloroquine, chlorthiazide, chlorpheniramine, cimetidine, cyclophosphamide, danazol, desimipramine, digitalis, digitoxin, digoxin, disulfiram, gold salts, heparin, heroin, hexopropymate, hydrochlorothiazide, hydroxyquinoline, insect bites, insecticides, IFN-α, IFN-β, iopanoic acid, isoniazid (INH), isotretinoin (vitamin A), levamisole, levodopa, lidocain, mercurial diuretics, mexilitine, minoxidil, nitroglycerin, nomifensine, oxprenolol, penicillamine, pentagastrin, procainamide, prochlorperazine, propylthiouracil, ranitidine, spironolactone, stibophen, tetanus toxoid, tetraethylammonium, thioguanine, thiouracil, toluene diisocyanate, turpentine, vinylchloride

สำหรับการวินิจฉัยภาวะเกล็ดเลือดต่ำจาก Quinine-dependent หรือ Quinidine-dependent thrombocytopenia (QN/QD-DT)¹ ต้องให้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 2 การทดสอบดังนี้

1. ตรวจพบแอนติบอดีต่อยาในพลาสมาหรือซีรัม
2. การทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro* test) พบเกล็ดเลือดมีความผิดปกติในหน้าที่ เช่น ลดลง หรือหายไป ในสภาวะที่มียา quinine และ/หรือ quinidine

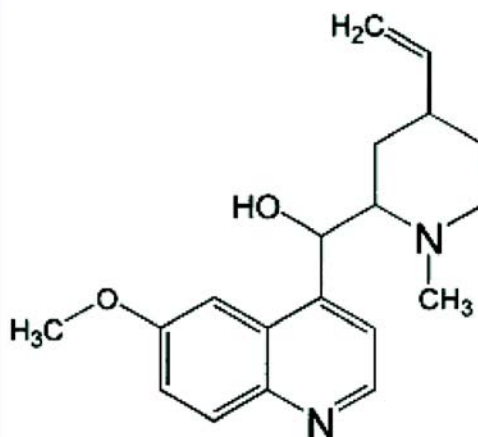
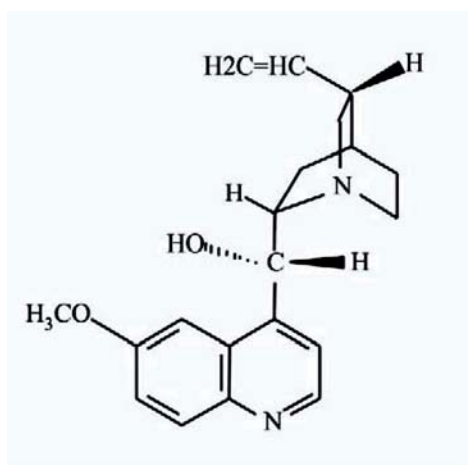
เทคนิคที่ใช้ทดสอบเพื่อยืนยันภาวะ QN/QD-DT มีหลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 2 แต่ที่นิยมใช้คือ Complement-mediated lysis of platelet after treatment with QN/QD และ Direct measurement of drug-dependent binding of patient IgG

ตารางที่ 2 เทคนิคทดสอบในหลอดทดลองสำหรับการตรวจวัด Quinine/Quinidine drug-dependent antibody

เทคนิค	หลักการ
Platelet suspension immunofluorescent test (PSIFT)	ตรวจหาแอนติบอดีบนเกล็ดเลือดด้วย fluorescent-conjugated secondary antibody
Radioimmunoassay	ตรวจหาแอนติบอดีบนเกล็ดเลือดด้วย radio-labeled protein A
Radioimmunoassay	ตรวจหาแอนติบอดีบนเกล็ดเลือดด้วย radio-labeled mouse monoclonal anti-human IgG
Platelet aggregometry	ตรวจวัดการแตกสลายของเกล็ดเลือดผ่านระบบ complement ด้วยเครื่อง aggregometer
Chromium lysis assay	ตรวจวัดการแตกสลายของเกล็ดเลือดผ่านระบบ complement โดยใช้ ⁵¹ Cr-labeled platelet

จากการศึกษาทำให้ทราบว่าโครงสร้างของ quinine และ quinidine มีส่วนสัมพันธ์กับการกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดี โดยพบว่าอนุพันธ์ของยาทั้งสองชนิดที่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีและเกิดพยาธิสภาพได้ คือ dihydro- และ desmethoxy-form แอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในร่างกาย เป็นหนึ่งในหลายปัจจัยที่ทำให้พยาธิสภาพมีความรุนแรงซึ่งประกอบด้วย

1. ปริมาณยาที่ได้รับในช่วงเวลาหนึ่งๆ
2. อนุพันธ์ของยาที่ได้รับ (รูปที่ 3)
3. จำนวน binding sites ของยาบนผิวเกล็ดเลือด
4. ความจำเพาะของแอนติบอดีต่อยาในอนุพันธ์ต่างๆ



รูปที่ 3 โครงสร้างชีวเคมีของยา Quinine (ซ้าย) และ Quinidine (ขวา)

Mechanism of binding of QN/QD drug-dependent antibodies to platelets

Christie และ Aster⁵ และ Van Leeuwen⁶ ได้จำลองเหตุการณ์ในหลอดทดลองโดยเติม [³H]QN ปริมาณคงที่ลงในเกล็ดเลือด และตรวจวัดปริมาณ QN บนผิวเกล็ดเลือดได้จากนั้นเติม QN-dependent antibody และตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีบนผิวเกล็ดเลือด^{6,9} พบว่า แอนติบอดีไม่จับกับ QN ดังกล่าวเลย แต่หากเติม QN เพิ่มในปริมาณที่มากพอเป็น free QN ในหลอดทดลอง พบว่า แอนติบอดีสามารถจับบนเกล็ดเลือด และตรวจพบได้ จึงในแนวคิดในการอธิบายกลไกที่แอนติบอดีจะเข้าจับบนเกล็ดเลือดไว้เป็น 2 ลักษณะ

1. QN-dependent antibodies ไม่ได้จับโมเลกุลยาบนผิวเกล็ดเลือดโดยตรง แต่เข้าจับกับ free QN เสียก่อน จากนั้นจึงถูกตรึงไว้บนเกล็ดเลือดผ่าน Fc receptor ที่มีอยู่บนเกล็ดเลือด

2. QN-dependent antibodies อาจจับกับโมเลกุลยาบนผิวเกล็ดเลือดโดยตรง แต่เนื่องจากการจับของโมเลกุลยาบนผิวเกล็ดเลือดไม่เสถียรและหลุดออกไปได้ง่าย ดังนั้นเมื่อมี free QN ในปริมาณที่มากพอจึงสามารถเข้าจับบนผิวเกล็ดเลือดได้ตลอดเวลา และแอนติบอดีเข้าจับที่โมเลกุลยาบนผิวเกล็ดเลือดได้โดยตรง ช่วยทำให้ drug-antibody complex เสถียรอยู่และตรวจพบได้

อย่างไรก็ตาม หลังจากทีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มได้พยายามทดสอบสมมุติฐานดังกล่าว กลับไม่พบหลักฐานใดๆ หรือมีข้อพิสูจน์เพื่อสมมุติฐานนั้นว่าแอนติบอดีจำเพาะต่อยาถูกตรึงบนเกล็ดเลือดผ่าน Fc receptor แต่มีหลักฐานในทางกลับกัน ว่าแอนติบอดีจับบนเกล็ดเลือดผ่านกลไกที่เรียกว่า Fc receptor-independent มีรายงานจำนวนมากที่ช่วยยืนยันกลไกดังกล่าวว่าน่าจะเป็นกลไกที่ถูกต้อง เพราะ

1. ไม่สามารถแสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีจำเพาะต่อ QN นั้นจับกับ QN ได้โดยตรง²

2. ไม่สามารถตรวจสอบ drug/antibodies immune complex ในซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วย⁶

3. Drug-dependent antibodies ไม่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับเกล็ดเลือดของผู้ป่วย Bernard-Soulier syndrome ได้แม้ว่าเกล็ดเลือดของผู้ป่วยเหล่านี้มีการแสดงออกของ Fc receptor ในระดับปกติ¹⁰

4. FMC25 ซึ่งเป็น monoclonal antibody จำเพาะต่อไกลโคโปรตีน gpIX ที่บริเวณ membrane-associated region (รูปที่ 5) สามารถยับยั้งไม่ให้ QN และ/หรือ QD จับกับเกล็ดเลือดได้แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งจับจำเพาะของ QN และ/หรือ QD อยู่ที่บริเวณดังกล่าว¹¹

5. FMC25 ไม่ว่าจะจับกับ F(ab')₂ หรือ intact IgG ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย acetone-aggregated IgG ซึ่งเป็นสารกระตุ้นที่ทำงานโดยใช้กลไก Fc receptor-mediated aggregation ซึ่งแสดงได้ชัดเจนว่า drug-dependent antibodies จับบนผิวเกล็ดเลือดได้นั้นไม่ได้อาศัย Fc receptor ที่อยู่บนเมมเบรนของเกล็ดเลือดเลย

6. มีรายงานผู้ป่วยที่พบ drug-dependent antibodies สองแบบในเวลาเดียวกัน แอนติบอดีที่จับบนเกล็ดเลือดและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลบนเม็ดเลือดขาวชนิดกรานูโลไซต์ แอนติบอดีทั้งสองชนิดมีความจำเพาะต่อเซลล์ต่างชนิดกัน แอนติบอดีที่ถูก elute ออกจากเกล็ดเลือด จะทำปฏิกิริยาเฉพาะต่อเกล็ดเลือดเท่านั้น เช่นเดียวกับแอนติบอดีที่ถูก elute จากเม็ดเลือดขาว ก็ไม่ทำปฏิกิริยากับเกล็ดเลือด แสดงให้เห็นว่าการที่แอนติบอดีจับบนเกล็ดเลือด หรือบนเซลล์เม็ดเลือดขาว ไม่ได้อาศัย Fc receptor ที่อยู่บนเซลล์ทั้งสองชนิดเลย แต่อาศัยความจำเพาะเพียงอย่างเดียว หรือผ่าน F(ab')₂ นั้นเอง¹²

7. van Leeuwen และคณะรายงานว่า F(ab')₂ ของ drug-dependent antibodies จากผู้ป่วย 3 รายมีความจำเพาะและสามารถจับกับเกล็ดเลือดและพิสูจน์ได้ด้วยวิธีการ competition ระหว่าง free drug กับ F(ab')₂ ของแอนติบอดี แสดงให้เห็นว่าการจับกันระหว่าง drug-dependent antibodies กับเกล็ดเลือดอยู่ที่ความจำเพาะและผ่าน F(ab')₂ ไม่ใช่อาศัย Fc receptor บนเกล็ดเลือด¹³

8. Christie และคณะพิสูจน์สมมุติฐานนี้เช่นกันและพบว่า drug-dependent antibody coated platelet สามารถทำให้เกิด rosette ของ Protein A sepharose bead ข้อมูลนี้ยังทำให้เกิดความมั่นใจว่า drug-dependent antibody จับเกล็ดเลือดได้โดยอาศัย F(ab')₂ เท่านั้น⁴

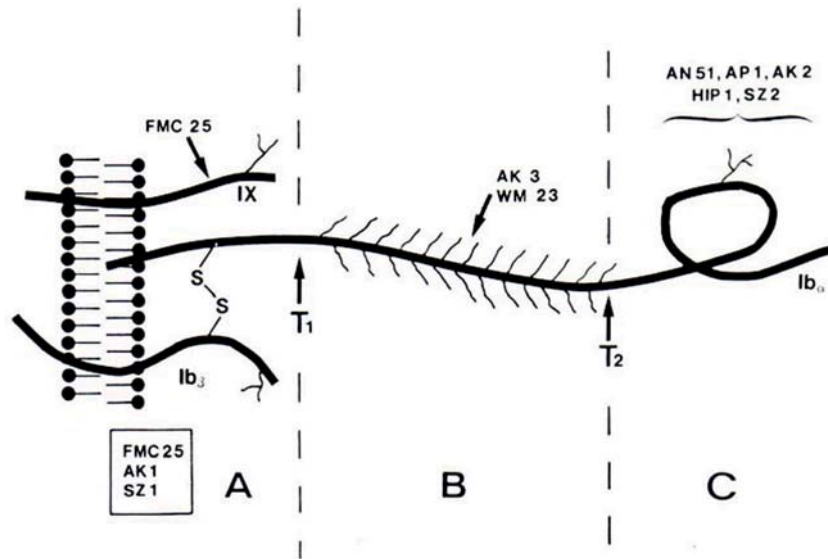
บทบาทของ gpIb-IX ต่อการกระตุ้น QN/QD drug-dependent antibodies

การสังเกตของนักวิทยาศาสตร์เริ่มต้นจากพบว่าเกล็ดเลือดของผู้ป่วย Bernard-Soulier syndrome (BSS) ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ QN/QD drug-dependent antibodies¹⁴ (QN/QD DDA) และข้อสังเกตนี้ได้รับการยืนยันจากงานวิจัยจำนวนมาก^{3,12,13} ซึ่งต่างตั้งสมมุติฐานว่าไกลโคโปรตีนที่บกพร่องหรือขาดหายไปบนเกล็ดเลือดของผู้ป่วย BSS น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องหรือกล่าวได้ว่าเป็นบริเวณที่มีตำแหน่งจำเพาะของแอนติบอดีดังกล่าว

BSS เป็นความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive ผู้ป่วยมีความบกพร่องของยีนที่กำหนดการสร้างไกลโคโปรตีนสำคัญ 4 ชนิดบนผิวเซลล์ ได้แก่ gpIb, gpIX, gpV

และโปรตีนขนาด 210 kD¹⁶⁻¹⁹ ทำให้เกล็ดเลือดมีความผิดปกติ ไม่สามารถเกิดการเกาะกลุ่มเมื่อถูกกระตุ้นด้วย von Willebrand factor ไม่ว่าจะเป็นคนหรือวัว และไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย ristocetin ผู้ป่วยมีเกล็ดเลือดต่ำ²⁰ ตรวจพบเกล็ดเลือดขนาดใหญ่ อาการทางคลินิกคือเลือดออกผิดปกติ โดยเป็นแต่กำเริบหรือมีประวัติเลือดออกง่าย หยดยากตั้งแต่วัยเด็ก เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางชีวเคมีของ gpIb/IX (รูปที่ 4) จะเห็นว่า gpIb α ซึ่งมีขนาด 135 kD มีตำแหน่งตัดของ prote-

olytic enzyme สองตำแหน่ง (T1 และ T2) ซึ่งทำให้ได้โมเลกุล 3 ขนาดที่แตกต่างกัน คือ บริเวณไกลิโคผิวเมมเบรนที่เรียกว่า membrane-associated region ขนาดประมาณ 25 kD (บริเวณ A) โมเลกุลขนาดใหญ่ที่เรียกว่า macroglycoprotein (บริเวณ B) และส่วนปลายสุดขนาด 45 kD (บริเวณ C) และหากเกล็ดเลือดหลังเอนไซม์ calpain ซึ่งทำงานโดยอาศัยแคลเซียม gpIb α จะถูกตัดที่บริเวณ T1 เท่านั้น ผลที่ได้คือบริเวณ B-C ซึ่งให้ชื่อว่า glycocalicin



รูปที่ 6-4 โครงสร้างของ gpIb α แสดงตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วย proteolytic enzyme (รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)

จากข้อมูลที่ทราบว่าเกล็ดเลือดของผู้ป่วย BSS ซึ่งมีความบกพร่องในการแสดงออกของ gpIb-IX ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ QN/QD DDA จึงมีคำถามว่า gpIb-IX มีความเกี่ยวข้องกับ QN/QD DDA การศึกษาโดยใช้ซีรัมของผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำเนื่องจาก QN/QD DDA ด้วยเทคนิค immunoprecipitation พบว่าตำแหน่งจำเพาะหรือ epitope(s) ของ QN/QD DDA อยู่ที่บริเวณ membrane region (บริเวณ A) ของ gpIX^{12,11,21} เท่านั้น ไม่ใช่ gpIb หรือแม้แต่ในบริเวณ glycocalicin²² การจับกันระหว่างแอนติบอดีกับเกล็ดเลือดสามารถยับยั้งได้ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อบริเวณ membrane-associated region (FMC25) ในตรงข้ามการใช้ AN51 ซึ่งเป็นแอนติบอดีจำเพาะต่อส่วน N-terminal ของ Ib α แม้จะสามารถยับยั้งการกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย ristocetin ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการแตกสลายของเกล็ดเลือดเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย QN/QD DDA และเมื่อทดสอบโดยการ treat เกล็ดเลือดด้วย calpain ซึ่งตัดส่วน glycocalicin ออก พบว่า QN/QD DDA ยังสามารถจับกับเกล็ดเลือดได้ หรือมีผลทำให้เกล็ดเลือดแตกสลายได้ การศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมายืนยันตำแหน่งจำเพาะ หรือ epitope(s) ของ

QN/QD DDA ว่าอยู่ที่ gpIX ในบริเวณ membrane-associated region ซึ่งเป็นตำแหน่งจับของ vWF และยังแสดงให้เห็นว่าบทบาทของยาทั้งสองชนิดในการกระตุ้นให้มีการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด มีกลไกคือการจับกันระหว่างโมเลกุลของยากับโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปจากเดิมหรือทำให้เกิดโมเลกุลใหม่ที่แสดงความเป็นแอนติเจน (neoantigen) และตำแหน่งดังกล่าวคือบริเวณ membrane-associated region ของ gpIb-IX และที่สำคัญคือปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดต้องการโครงสร้างที่เหมาะสมซึ่งเกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของยาและโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT)

เป็นที่ทราบกันดีว่า การรักษาด้วยเฮพารินมักทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ อุบัติการณ์มีได้ตั้งแต่ 1-30% แต่จากการศึกษาพบว่าที่เกี่ยวข้องและมีสาเหตุจากเฮพารินจริงๆ นั้นมีเพียงประมาณ 5% เท่านั้น HIT แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกันชัดเจนทั้งด้านคลินิก พยาธิกำเนิดและผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ HIT type I และ HIT type II/23

HIT type I บางครั้งเรียกว่า Heparin-associated thrombocytopenia เนื่องจากพยาธิกำเนิดเป็นแบบ non-immune มัก ไม่มีอาการทางคลินิก หรือมีแต่ไม่ชัดเจนและไม่รุนแรงอาการ เกิดขึ้นได้ภายใน 1-2 วันหลังรับยาและเกิดได้กับทุกคนไม่ว่า จะเคยมีประวัติรับยามาก่อนหรือไม่ภาวะเกล็ดเลือดต่ำไม่รุนแรง จำนวนนับมากกว่า 100,000/cu.mm และไม่มีอาการแทรกซ้อนจากการเกิด thromboemboli เชื่อว่า ภาวะเกล็ดเลือดต่ำน่าจะเกิดจากเกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่มกันเองในสภาวะที่มีเฮพาริน²⁴

HIT type II พยาธิกำเนิดคือ มีการกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดี ข้อสังเกต

1) คือระยะเวลาที่เกิดอาการทางคลินิกอยู่ที่ประมาณ 7-12 วันหลังรับยา ซึ่งตรงกับช่วงระยะเวลาของการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

2) ผู้ป่วยมีระดับ platelet-associated IgG สูงขึ้นในกระแสเลือดขณะมีอาการทางคลินิก²⁵ และ

3) การตรวจพบปัจจัยหลายชนิดในกระแสเลือดที่บ่งชี้ว่าเกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่มกันในขณะเกิดอาการทางคลินิก เช่น serotonin²⁴, thromboxane²⁵ โดยพบใน IgG fraction²⁴ อาการทางคลินิกรุนแรง ประมาณ 30% ของผู้ป่วยเสียชีวิตและประมาณ 20% เกิดการอุดตันในหลอดเลือดแดง ทำให้อวัยวะขาดเลือด จากการศึกษาพยาธิสรีรวิทยาของอาการทางคลินิก ซึ่งเป็นผลจากแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด พบว่ามีสองลักษณะแตกต่างกันที่ความต้องการเฮพาริน ได้แก่ Heparin-dependent antibody และ Heparin-independent antibody

ลักษณะและกลไกการก่อพยาธิสภาพของ heparin-dependent antiplatelet antibody

แอนติบอดีที่พบส่วนใหญ่เป็น IgG มีในบางรายที่พบทั้งชนิด IgG และ IgM ร่วมกัน มีน้อยที่พบเป็นชนิด IgM เท่านั้น²⁶ แอนติบอดีที่พบสามารถตรึงคอมพลีเมนต์ได้ แต่ไม่ทำให้เกิดการแตกของเกล็ดเลือด²⁶ อย่างไรก็ตาม พบว่าการตรึงคอมพลีเมนต์มีผลในการกระตุ้นเกล็ดเลือดให้เกิดการเกาะกลุ่มและมีหลัง serotonin ได้²⁶

Heparin-dependent antibody มีลักษณะพิเศษแตกต่างจาก antibodies จำเพาะต่อเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นในลักษณะอื่นๆ กล่าวคือทำให้เกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่มอย่างแรง (platelet aggregating activity) ดังนั้นในทดสอบ heparin-dependent antibody ในซีรัมผู้ป่วย จึงอาศัยคุณสมบัติการทำให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญ แอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นจากยาชนิดอื่นเช่น quinine/quinidine พบว่า ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้เช่นกัน แต่จากการศึกษาภายหลังพบว่า

ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงในการทดสอบด้วย aggregometer นั้น เป็นผลจากการที่เกล็ดเลือดแตกสลาย ไม่ได้เกิดจากการเกาะกลุ่ม²⁸

คุณสมบัติอื่นๆ ได้แก่ การกระตุ้นการสร้างและหลั่ง thromboxane A₂ (TXA₂) ในปริมาณมาก เมื่อทดสอบด้วยการ incubate เกล็ดเลือดกับซีรัมผู้ป่วย ซึ่งไม่พบคุณสมบัตินี้ในแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่เกิดจากสาเหตุอื่นๆ เช่น autoantibodies ในผู้ป่วย ITP หรือ anti-PI^{A1} ในผู้ป่วย PTP²⁹ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ degranulation ของกรานูลในเกล็ดเลือด ทำให้เพิ่มการหลั่งสารประกอบสำคัญ คือ serotonin³⁰ และ platelet factor3 (PF3)³¹

ในการทดสอบเพื่อยืนยันแอนติบอดี ต้องอาศัยการเฮพารินเติมลงในหลอดทดลองที่มีซีรัมของผู้ป่วย ด้วยคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นเกล็ดเลือด ทำให้มีการหลั่งสารประกอบสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นทั้ง procoagulant และ proaggregating โดยเฉพาะอย่างยิ่ง TXA₂ นักวิจัยจึงอธิบาย พยาธิสรีรวิทยาของอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นว่า โปรตีนที่หลังจากเกล็ดเลือดดังกล่าวกระตุ้นการเกิด thrombus ทำให้เกิด thromboemboli ขึ้น ประกอบกับแอนติบอดีสามารถกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้เป็นอย่างดี และไม่เกิดการแตกของเกล็ดเลือดแม้ว่าจะสามารถตรึงคอมพลีเมนต์ได้ จึงทำให้เกล็ดเลือดเข้าเกาะกลุ่มกับ thrombus และมีขนาดใหญ่ขึ้น (formation of circulating platelet aggregates) จนอุดตันหลอดเลือด และปริมาณเกล็ดเลือดลดลงเป็นลำดับเนื่องจากเข้าเกาะกลุ่มกับ thrombus²⁸ ลักษณะนี้ตรงข้ามกับแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือดที่เกิดจากกลไกอื่นๆ เพราะไม่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่ม หรือแม้ว่าจะมีการเกาะกลุ่มแต่ไม่รุนแรง ขนาดของ thrombus ไม่ใหญ่เพราะเกล็ดเลือดถูกทำลายไปจากการที่แอนติบอดีตรึงคอมพลีเมนต์และเกิดกระบวนการกระตุ้นคอมพลีเมนต์อย่างสมบูรณ์

ลักษณะและกลไกการก่อพยาธิสภาพของ heparin-independent antiplatelet antibody

แอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยจำนวนหนึ่ง สามารถทำปฏิกิริยาและกระตุ้นเกล็ดเลือดได้ในหลอดทดลอง แม้ว่าไม่มีเฮพารินร่วมด้วย เรียกว่า heparin-independent antibodies³² อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติของแอนติบอดีที่มีจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีเฮพาริน³³ คุณสมบัติดังกล่าวได้แก่การจับและกระตุ้นเกล็ดเลือดคนปกติได้ แม้ไม่มี เฮพารินร่วมด้วยและมีผลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มได้เมื่อเติม epinephrine³⁴

นักวิจัยได้อธิบายกลไกและคุณสมบัติของแอนติบอดีในกลุ่มนี้ไว้เป็น 3 ลักษณะคือ

1. เฮพารินจับกับโมเลกุลใดๆ บนผิวเกล็ดเลือด เกิดเป็นโมเลกุลใหม่ที่กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี แอนติบอดีที่ถูกสร้างขึ้นสามารถจับกับโมเลกุลเฮพารินบนผิวเกล็ดเลือดได้ ในเวลาเดียวกันก็สามารถจับกับโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดได้เช่นกัน (cross-react) จึงเห็นได้ว่าแม้ไม่มีเฮพาริน แอนติบอดียังสามารถจับและกระตุ้นเกล็ดเลือดได้ แต่จะมีผลมากขึ้นในสภาวะที่มีเฮพารินร่วมด้วย

2. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายมีลักษณะเป็น polyclonal antibodies ดังนั้นจึงมีแอนติบอดีหลายชนิดในซีรัม ได้แก่แอนติบอดีที่จำเพาะต่อทั้งโมเลกุลของเฮพาริน หรือโมเลกุลใดๆ บนผิวเกล็ดเลือดอยู่ร่วมกัน และ/หรือโมเลกุลใหม่ที่เกิดจากการรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเฮพารินและโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด ดังนั้นการทดสอบในหลอดทดลอง แม้ไม่มีเฮพารินอยู่ด้วย แอนติบอดีในซีรัมก็ยังมีผลต่อเกล็ดเลือดได้ โดยที่ผลดังกล่าวจะแรงมากขึ้นเมื่อมีเฮพารินร่วมด้วย เพราะแอนติบอดีทุกชนิดทำงานพร้อมกันทั้งหมด

3. เมื่อเฮพาริน (หรือ epinephrine) จับกับโมเลกุลใดๆ บนผิวเกล็ดเลือด มีผลทำให้เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นและมีการแสดงออกของโมเลกุลใหม่บนเมมเบรน โมเลกุลใหม่นี้แสดงความเป็นแอนติเจนกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นแม้ว่าไม่มีเฮพารินในหลอดทดสอบ เกล็ดเลือดคนปกติในภาวะที่มี epinephrine ก็สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วย และถูกกระตุ้นให้มีการเกาะกลุ่มได้³³

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าสิ่งที่ทำหน้าที่เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันคือเฮพาริน ไม่ใช่องค์ประกอบอื่นๆ ที่ปะปนอยู่ เฮพารินจากสัตว์ต่างชนิดกัน มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้แตกต่างกัน หรือแม้แต่จากแหล่งเดียวกันแต่ต่างเวลาลิต ก็มีความสามารถต่างกันไปด้วย การศึกษาพบว่า เฮพารินที่สกัดจากปอดของวัว มีอุบัติการณ์สูงในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี³⁴ นอกจากความแตกต่างในเรื่องแหล่งที่มาแล้ว ยังพบว่าแอนติบอดีที่พบในซีรัมผู้ป่วยสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกันได้ระหว่างเฮพารินต่างแหล่ง หรือต่างเวลาลิตด้วย³⁵ รวมถึงทำปฏิกิริยาข้ามได้กับ low-molecular weight heparin และ/หรือสารคล้ายคลึงเฮพารินที่เรียกว่า heparinoid³⁶⁻³⁸

Heparin-dependent antibody ยังสามารถจับกับเซลล์หลอดเลือด (endothelial cells) และกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ได้เช่นกัน แม้จะอยู่ในสภาวะที่ไม่มีเฮพาริน การจับกันระหว่างแอนติบอดีและผนังหลอดเลือดจะดีขึ้นเมื่อมีเฮพารินอยู่ในหลอดทดสอบ²⁶ จากการศึกษาพบว่า แอนติบอดีจับกับเซลล์

หลอดเลือดผ่าน cell-bound heparin และ/หรือ glycosaminoglycans (GAGs)²⁶ ของโมเลกุลที่อยู่บนเซลล์ผนังหลอดเลือด ส่งผลให้มีการกระตุ้นเซลล์ผนังหลอดเลือดและมีการแสดงออกของ tissue factor²⁶

กลไกของปฏิสัมพันธ์ระหว่างเกล็ดเลือด เฮพารินและแอนติบอดี

มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและได้ข้อสรุปเป็น 2 ลักษณะคือ

1. Fc-mediated mechanism เฮพารินจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะ ในลักษณะของ antigen-antibody complex จากนั้นทั้งหมดถูกตรึงไว้บนเกล็ดเลือดผ่าน Fc receptor^{27, 39-40}

2. Fc-independent mechanism ในลักษณะนี้เฮพารินจับบนผิวเกล็ดเลือดในลักษณะใดๆ (จับกับโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดหรือทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน) เสียก่อน จากนั้นแอนติบอดี ที่จำเพาะเข้าจับกับเฮพารินผ่าน Fab fragment⁴¹⁻⁴²

โปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดที่เป็นตัวรับจำเพาะสำหรับเฮพาริน (Heparin binding protein)

โปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดหลายชนิดได้รับการยืนยันแล้วว่าทำหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะสำหรับเฮพาริน หรือสามารถจับและสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับเฮพาริน จากการศึกษาด้วยเทคนิค crossed-affinity immunoelectrophoresis พบว่า มีโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดที่สามารถจับกับเฮพารินได้ทั้งสิ้น 6 ชนิด⁴³ ได้แก่ gpIb, antigens 17, 25 (เข้าใจว่าน่าจะเป็น gpIa-IIa complex และ gpV ตามลำดับ), Platelet factor 4 (PF4), Thrombospondin และ Protein G4 สามชนิดแรกเป็นโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด ส่วนสามชนิดหลังเป็นโมเลกุลหลังจาก α -granule ซึ่งน่าจะเกิดจากภายหลังการกระตุ้นเกล็ดเลือด เกิด degranulation สารประกอบเหล่านี้ถูกหลั่งจากกรานูล ออกสู่ภายนอกและตรวจพบได้บนผิวเกล็ดเลือด

โปรตีนต่างๆ ที่สามารถจับกับเฮพารินได้มีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต่างๆ เหล่านี้และพบว่ามีบางสิ่งที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกัน

ยกตัวอย่างการศึกษาในโมเลกุล gpIb ซึ่งเชื่อว่าเป็นโมเลกุลหลักที่จับกับ เฮพาริน พบว่ามีสิ่งที่น่าสนใจ ทำให้สามารถยืนยันได้ว่า gpIb เป็น antigen หรือ receptor สำหรับ heparin-dependent antibody โดยที่ตำแหน่งที่จับนั้นน่าจะใกล้เคียงกับ gpIb มากกว่าที่จะเป็น gpIb โดยตรง หลักฐานยืนยันประกอบด้วยข้อมูลที่ว่า

1. gplb มี affinity ต่อเฮพาริน⁴³
2. Monoclonal antibody จำเพาะต่อ gplb หรือจำเพาะต่อ Tryptic fragment สามารถยับยั้ง heparin-induced platelet aggregation ได้⁴⁴
3. แต่พบว่า ซีรัมผู้ป่วยที่มีภาวะ heparin-induced thrombocytopenia สามารถกระตุ้นให้เกิดเลือดของผู้ป่วย Bernard-Soulier syndrome (BSS) ซึ่งขาด gplb เกิด aggregation ได้²⁴

สรุป

ยาหลายชนิดมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีต่อเกล็ดเลือด ผลคือทำให้เกิดการกระตุ้นให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ ในผู้ป่วย เช่น เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มผิดปกติ หรือมีการแตกทำลายเกล็ดเลือด การเกิด Thromboemboli และมีระดับเกล็ดเลือดต่ำ พยาธิกำเนิดมีกลไกต่างกันไปยาที่ได้รับการศึกษามากที่สุดคือ Quinine/Quinidine และ Heparin ซึ่งมีกลไกแตกต่างกัน รวมถึงลักษณะของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นด้วย โดยกรณีแรกเกิดจากการที่โมเลกุลของยาเข้าจับกับ gplb-IX เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่แสดงความเป็นแอนติเจน กระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี ในขณะที่อย่างหลังสามารถเกิดได้ทั้งสองลักษณะคือ ยากระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี และถูกตรึงไว้บนเกล็ดเลือดผ่าน Fc receptor และ/หรือยาจับกับโปรตีนบนผิวเกล็ดเลือดเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่แสดงความเป็นแอนติเจนต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

เอกสารอ้างอิง

1. Hackett T, Kelton JG and Powers P. Drug-induced platelet destruction. Semin Thromb Hemost 1982; 8: 116
2. Shulman NR. Immunoreactions involving platelets: A steric and kinetic model for formation of a complex from a human antibody, quinidine as a hapten, and platelets; and for fixation of complement by the complex. J Exp Med 1958; 107: 665
3. Adachi JD, Bensen WG, Kassam Y, Powers PJ, Bianchi FA, Cividino A, Kean WF, Rooney PJ, Craig GL, Buchanan WW, Tugwell PX, Gordon DA, Lucarelli A, Singal DP. Gold induced thrombocytopenia : 12 cases and a review of the literature. Semin Arthritis Rheum 1987; 16: 287
4. Chong BH, Berndt MC, Koutts J and Castaldi PA. Quinidine-induced thrombocytopenia and leucopenia : demonstration and characterization of distinct antiplatelet and antileukocyte antibodies. Blood 1983; 62: 1218
5. Aster RH. The immunologic thrombocytopenia. In: Thomas JK and James NG (Eds), Platelet immunobiology : Molecular and clinical aspects. Philadelphia, JB Lippincott Company, 1987, pp.387-435
6. Christie DJ and Aster RH. Drug-antibody-platelet interaction in quinine- and quinidine-induced thrombocytopenia. J Clin Invest 1982; 70: 989
7. van Leeuwen EF, Engelfriet CP and von dem Borne AEGKr. Studies on quinine- and quinidine-dependent antibodies against platelets and their reaction with platelets in Bernard-Soulier syndrome. Br J Haematol 1982; 51: 551
8. Kelton JG, Meltzer D, Moore J, Giles AR, Wilson WE, Barr R, et al. Drug-induced thrombocytopenia is associated with increased binding of IgG to platelets both in vivo and in vitro. Blood 1981; 58: 524
9. Smith ME, Jordan JV Jr, Reid DM, Jones CE and Shulman NR. Drug-antibody binding to platelets is mediated by the Fab domain and is not Fc-dependent (abstr). Blood 1984; 64:274A
10. von dem Borne EGKr, Helmerhorst FM, van Leeuwen EF, Pegels HG, von Riesz and Engelfriet CP. Autoimmune thrombocytopenia: Detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. Br J Haematol 1980; 45: 319.

11. Pfueller SL, de Rosbo NK, Bilston RA. Platelet deficiency in glycoprotein I have normal Fc receptor expression. *Br J Haematol* 1984; 56: 607
12. Berndt MC, Chong BH, Bull HA, Zola H and Castaldi PA. Molecular characterization of quinine/quinidine drug-dependent antibody platelet interaction using monoclonal antibodies. *Blood* 1985; 66: 1292
13. Lerner W, Caruso R, Faig D and Karparkin S. Drug-dependent and non-drug-dependent antiplatelet antibody drug-induced immunologic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1985; 66: 306
14. Christie DJ, Weber RW, Mullen PC, Cook JM and Aster RH. Structural features of the quinidine and quinine molecules necessary for binding of drug-induced antibodies to human platelets. *J Lab Clin Med* 1984; 104: 730
15. Kunicki TJ, Johnson MM and Aster RH. Absence of the platelet receptor for drug-dependent antibodies in Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest* 1978; 62: 716
16. Berndt MC, Gregory C, Chong BH, Zola H and Castaldi PA. Additional glycoproteins defects in Bernard-Soulier syndrome: Confirmation of genetic basis by parental analysis. *Blood* 1983; 62: 800
17. Clemetson KJ, McGregor JL, James E, Dechavanne M and Luscher EF. Characterization of platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *J Clin Invest* 1982; 70: 304
18. Stricker RB and Shuman MA. Quinidine purpura: Evidence that glycoprotein V is a target platelet antigen. *Blood* 1986; 67: 1377
19. Stricker RB, Wong D, Saks SR, Corash L and Shuman MA. Acquired Bernard-Soulier syndrome. *J Clin Invest* 1985; 76: 1274
20. Berndt MC and Caen JP. Platelet glycoproteins. In Spaet T (Ed), *Progress in hemostasis and thrombosis*. Volume 7, Orlando, Grune & Stratton 1984, 111.
21. Devine DV and Rosse WF. Identification of platelet proteins that bind alloantibodies and autoantibodies. *Blood* 1984; 64: 1240
22. Kunicki TJ, Russell N, Nurden AT, Aster RH and Caen JP. Further studies of the human platelet receptor for quinine- and quinidine-dependent antibodies. *J Immunol* 1981; 126: 398
23. Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Rev* 1988; 2: 108
24. Chong BH, Castaldi PA. Platelet proaggregating effect effect of heparin: Possible mechanism for non-immune heparin-associated thrombocytopenia. *Aust NZ J Med* 1986; 16: 715
25. Fratanoni JC, Pollat R, Gralnick H. Heparin-induced thrombocytopenia-Confirmation of diagnosis with in vitro methods. *Blood* 1975; 45: 395
26. Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S. Immune endothelial cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Eng J Med* 1986; 316: 581
27. Cines DB, Kaywin P, Bina M, Tomaski A, Schreiber AD. Heparin-associated thrombocytopenia. *N Eng J Med* 1980; 303: 788
28. Deykin D, Hellerstein LJ. The assessment of drug-dependent and isoimmune antiplatelet antibodies by the use of platelet aggregometry. *J Clin Invest* 1972; 51: 3142
29. Chong BH, Pitney WR, Castaldi PA. Heparin-induced thrombocytopenia: Association of thrombotic complications with heparin-dependent IgG antibody that induces thromboxane synthesis and platelet aggregation. *Lancet* 1982; 2: 1246
30. Fratanoni JC, Pollat R, Gralnick H. Heparin-induced thrombocytopenia - Confirmation of diagnosis with in vitro methods. *Blood* 1975; 45: 395

31. Chong BH, Grace CS, Rozenberg MC. Heparin-induced thrombocytopenia: Effect of heparin platelet antibody on platelets. *Br J Haematol* 1981; 49: 531
32. Sandler RM, Seifer DB, Morgan K, Pockros PJ, Wypych J, Weiss LM, Schiffman H. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis: Detection and specificity of a platelet-aggregating IgG. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 760
33. Pfuller SL, David R. Different platelet specificities of heparin-dependent platelet aggregating factors in heparin-associated immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1986; 64: 149
34. Powers PJ, Kelton JG, Carter CJ. Studies on the frequency of heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Res* 1984; 33: 439
35. Bell WR, Royall RM. Heparin-associated thrombocytopenia: A comparison of three heparin preparations. *N Eng J Med* 1980; 303: 237
36. Leroy J, Leclerc MH, Delahousse B, Guerois C, Foloppe P, Gruel Y, Toulemonde F. Treatment of heparin-associated thrombocytopenia and thrombosis with low molecular weight heparin (CY216). *Semin Thromb Hemost* 1985; 11: 326
37. Trowbridge AA, Caraveo J, Green JB, Amaral B, Stone MJ. Heparin-related immune thrombocytopenia. Studies of antibody-heparin specificity. *Am J Med* 1978; 65: 277
38. Vitoux JF, Mathieu JF, Roncato M, Fiessinger JN, Aiach M. Heparin-associated thrombocytopenia : Treatment with low molecular weight heparin. *Thromb haemostasis* 1980; 55: 37
39. Castaldi PA, Davies PH, Berndt MC. Anti-platelet heparin-dependent antibody interacts with the platelet Fc-receptor (abstr). *Thromb Haemostasis* 1985; 54: 61
40. Kelton JG, Sheridan DP, Santos AV, Moore JC. The pathophysiology of heparin-induced thrombocytopenia (abstr). *Blood* 1985; 66: 290a
41. Green D, Harris K, Reynolds N, Roberts M, Patterson R. heparin immune thrombocytopenia—Evidence for a heparin-platelet complex as the antigenic determinant. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 167
42. Shanberger JN, Kambayashi J, Nakagawa M. The interaction of platelets with a tritium-labeled heparin. *Thromb Res* 1976; 9: 595
43. Gogstad GO, Solum NO, Krutnes MB. Heparin-binding platelet proteins demonstrated by crossed-affinity immunoelectrophoresis. *Br J Haematol* 1983; 53: 563
44. Adelman B, Sobel M, Fujimura Y, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Platelet glycoprotein Ib is a binding site that participates in platelet aggregation in heparin-associated thrombocytopenia (abstr). *Clin Res* 1986; 34: 449a