

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบผลกระทบบของสารกันเลือดแข็งต่อการเกิดการกระตุ้นของเกล็ดเลือด ในหลอดทดลองโดยวิธีโฟลไซโตเมตรี

หนึ่งฤทัย นิมนุช * และ สาวิตรี เจียมพานิชยกุล***

บทคัดย่อ

การกระตุ้นเกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดลิ่มเลือดอุดตันและการห้ามเลือด ดังนั้นการตรวจเลือดเพื่อป้องกันการกระตุ้นเกล็ดเลือดในร่างกายจึงมีประโยชน์ในการประเมินผู้ป่วยลิ่มเลือดอุดตัน อย่างไรก็ตาม การตรวจวัดการกระตุ้นเกล็ดเลือดต้องการสารกันเลือดแข็งและวิธีการที่มั่นใจได้ว่าการกระตุ้นเกล็ดเลือดไม่ได้เกิดขึ้นในหลอดทดลอง ดังนั้นเพื่อศึกษาสารกันเลือดแข็งต่อการเกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือด จึงเปรียบเทียบการเก็บเลือดจากผู้บริจาคสุขภาพดีโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD), CTAD+citric acid, 3.2% sodium citrate และ K₃EDTA เลือดในสารกันเลือดแข็งแต่ละชนิดยังแบ่งเป็นการตรึงและไม่ตรึงด้วย 4% พาราฟอร์มัลดีไฮด์ จากนั้นตรวจหาการกระตุ้นเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นเองในหลอดทดลองโดยวิธี indirect immunofluorescence และโฟลไซโตเมตรีโดยใช้โมโนโคลนอล แอนติบอดี CD62P ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์เกล็ดเลือดที่แสดงออก CD62P มีค่าต่ำในตัวอย่างที่มีการตรึง และพบว่าเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็ง CTAD+citric acid และตรึงด้วยพาราฟอร์มัลดีไฮด์มีการกระตุ้นเกล็ดเลือดต่ำ (2.37 ± 0.72 %) เมื่อเทียบกับเลือดใน CTAD, 3.2% sodium citrate และ K₃EDTA (5.73 ± 1.84 %, 4.92 ± 2.09 %, 4.27 ± 1.86 %) ตามลำดับ การศึกษานี้กล่าวได้ว่าควรเก็บเลือดในสารกันเลือดแข็ง CTAD+citric acid ร่วมกับการตรึงด้วยพาราฟอร์มัลดีไฮด์สำหรับตรวจวัดการกระตุ้นเกล็ดเลือดในร่างกาย วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2552; 42: 102-111.

คำห้ส : เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น ลิ่มเลือดอุดตัน CTAD 3.2%sodium citrate EDTA

* ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ หน่วยเครือข่าย ณ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract : Comparison of the effect of anticoagulants on *in vitro* spontaneous platelet activation by flow cytometry

Nungruthai Nimmuch* and Sawitree Chiampanichayakul*.,**

Activation of platelets plays a crucial role in the pathophysiology of thrombosis and hemostasis. Blood test reflecting *in vivo* platelet activation is therefore potentially useful in evaluating patients with thrombosis. However, monitoring of platelet activation requires an anticoagulant and protocol ensures that platelets activation status is not altered artifactually *in vitro*. To investigate effect of anticoagulants on platelet activation, blood from healthy donors were separately collected in citrate theophylline adenosine dipyridamole (CTAD), CTAD plus citric acid, 3.2% sodium citrate and K₃EDTA. Each sample was divided into two groups of experiments, with or without 4% paraformaldehyde (PFA) fixation. The spontaneous *in vitro* platelet activation was investigated by indirect immunofluorescence and analyzed by flow cytometry using CD62P monoclonal antibody. The results showed that percentage of CD62P-expressing platelets was markedly low in fixed sample. With PFA fixation, blood sampled drawn in CTAD plus citric acid showed less spontaneous platelet activation (2.37 ± 0.72 %) than those in CTAD, 3.2% sodium citrate and K₃EDTA (5.73 ± 1.84 %, 4.92 ± 2.09 %, 4.27 ± 1.86 %), respectively. In present study, it was conclude that blood sample intended for measuring of *in vivo* platelet activation should be collected in CTAD plus citric acid together with PFA fixed. **Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2009; 42: 102-111.**

Keyword: activated platelet, thrombosis, CTAD, 3.2%sodium citrate, EDTA

* Department of Medical Technology Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 50200

** Biomedical Technology Research Center, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 50200

ที่มาและปัญหาวิจัย

เกล็ดเลือด (platelet) คือ ส่วนไซโตพลาสซึมของ เมกะคาริโอไซต์ ซึ่งถูกปล่อยออกสู่กระแสเลือด เพื่อทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการห้ามเลือด โดยเมื่อ หลอดเลือดเกิดบาดแผลและมีการฉีกขาดจนถึงชั้น

subendothelium จะทำให้เกิดเลือดมีการยึดเกาะ มีการกระตุ้นเกล็ดเลือดและการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด เพื่ออุดบาดแผลป้องกันไม่ให้เลือดไหลออกนอกร่างกาย โดยพบว่าเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นเป็นจุดสำคัญทำให้เกิดลิ่มเลือด (thrombus) อย่างไรก็ตาม พบว่ามีการ

กระตุ้นเกล็ดเลือดในร่างกายซึ่งก่อให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) แบบผิดปกติโดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดสมอง² เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในอันดับต้นๆ ของประชากรในประเทศไทย เช่น peripheral arterial disease, atherosclerosis, myocardial infarction เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นของ เกล็ดเลือดในร่างกาย (*in vivo*) และลิ่มเลือดอุดตันเกิดขึ้นได้ง่ายในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ธาลัสซีเมีย และมะเร็ง จากความสำคัญของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นดังกล่าว จึงนำมาซึ่งแนวความคิดตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในร่างกาย เพื่อใช้บ่งชี้ภาวะการเกิดลิ่มเลือดอุดตันในลำดับต่อมา วิธีที่นิยมใช้ตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นคือ วิเคราะห์การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะโดยวิธีโฟลไซโตเมตรี อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยวิธีดังกล่าวจะต้องคำนึงถึงคุณภาพและการเตรียมตัวอย่างส่งตรวจเพื่อลดปัญหาการกระตุ้นของเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นเองในหลอดทดลอง (*spontaneous in vitro platelet activation*) เนื่องจากพบว่ามีความผิดพลาดของผลการตรวจวิเคราะห์อยู่บ่อยครั้ง ซึ่งมักเกิดจากคุณภาพของสิ่งส่งตรวจมากกว่าวิธีการที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ โดยเฉพาะขั้นตอนการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดเป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้มีการกระตุ้นของเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง และเกิดผลบวกปลอมจากการตรวจวิเคราะห์ได้ ส่งผลให้วินิจฉัยและให้การรักษาคิดพลาด การรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะ thrombosis โดยมีเกล็ดเลือดเป็นสาเหตุของการเกิดโรคนั้น แพทย์ใช้ยาต้านเกล็ดเลือด (anti-platelet agent) สำหรับรักษาผู้ป่วย ยาดังกล่าวมีผลข้างเคียงที่สำคัญ ได้แก่ การเกิดภาวะเลือดออก (bleeding)³ นอกจากนี้ยัง พบการเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia)^{3,4} และร่างกายอาจสร้างแอนติบอดีต่อยาที่ได้รับ (anti-drug antibody)^{5,6} อีกด้วย ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในร่างกาย จึงต้องมีความระมัดระวังและป้องกันไม่ให้เกิดการกระตุ้นของเกล็ดเลือดภายหลังจากการเจาะเก็บตัวอย่างเลือด ความผิดพลาดดังกล่าวอาจเกิดจากการเลือกใช้สารกันเลือดแข็งที่ไม่เหมาะสม⁷ โดยทั่วไปแล้วการ

ตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะใช้สารกันเลือดแข็งที่มีคุณสมบัติในการจับกับแคลเซียมไอออน เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเลือดถูกกระตุ้น และยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ สารกันเลือดแข็งที่นิยมใช้ได้แก่ 3.2% sodium citrate และ EDTA⁹ ปัจจุบันมีสารกันเลือดแข็งอีกชนิดที่ชื่อว่า Citrate-Theophylline-Adenosine-Dipyridamole หรือ CTAD ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการกระตุ้นของเกล็ดเลือดได้ดี CTAD มีส่วนผสมของ citrate ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียมไอออนได้อย่างรวดเร็ว^{8,9} Adenosine ทำหน้าที่กระตุ้น membrane adenylate cyclase^{8,9} ส่วน theophylline และ Dipyridamole ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ adenosine 3'5'-monophosphate (cAMP) phosphodiesterase^{8,9} จากคุณสมบัติของสารที่เป็นส่วนประกอบทั้งหมดทำให้ CTAD เป็นสารกันเลือดแข็งที่มีคุณภาพสูงในการใช้เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจากภายในร่างกาย (*in vivo platelet activation*) ได้อย่างแท้จริง อย่างไรก็ตาม พบว่าสารกันเลือดแข็ง CTAD ไม่ได้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในทางคลินิก เนื่องจากมีราคาแพง ต้องสั่งซื้อและนำเข้าจากต่างประเทศ

การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมสารกันเลือดแข็ง CTAD ขึ้นใช้เอง และศึกษาผลของการใช้สารกันเลือดแข็งชนิด CTAD, CTAD + citric acid, 3.2% sodium citrate และ K₃EDTA ต่อการกระตุ้นเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังต้องการศึกษาผลของการตรึงเกล็ดเลือด โดย paraformaldehyde ร่วมกับการใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ ต่อการเกิดการกระตุ้นของเกล็ดเลือดใน หลอดทดลอง

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมสารกันเลือดแข็ง

เตรียมสารกันเลือดแข็งชนิด Citrate-Theophylline-Adenosine-Dipyridamole (CTAD) ซึ่งประกอบไปด้วย 0.109M sodium citrate, 15mM theophylline (Sigma), 3.7mM adenosine (Fluka, Biochemika), 0.198mM dipyridamole (Calbiochem), สารกันเลือดแข็งชนิด CTAD + citric acid ที่มีส่วนผสมของ 0.4 mol/L citric acid หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง

ชนิด K_3EDTA และหลอดเก็บ ตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด 3.2% sodium citrate (Becton Dickinson)

กลุ่มตัวอย่าง

เจาะเลือดจากผู้บริจาคสุขภาพดีไม่ได้อยู่ระหว่างการได้รับยาที่มีผลต่อการทำงานของเกล็ดเลือด เช่น aspirin ในช่วงระยะเวลาก่อนหน้า 7-10 วัน จำนวน 9 ราย แบ่งใส่สารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ ดังนี้ CTAD, CTAD+citric acid, 3.2% sodium citrate และ K_3EDTA โดยตัวอย่างเลือดจากสารกันเลือดแข็งตัวแต่ละชนิดยังแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มของสารกันเลือดแข็งที่มีการเติม 4% paraformaldehyde (PFA) และกลุ่มที่ไม่มีการเติม 4% paraformaldehyde

การเตรียมเกล็ดเลือด

เจาะเลือดจากผู้บริจาคจำนวน 18 ml แบ่งใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ ที่มีการเติมและไม่เติม PFA จากนั้นผสมเลือดให้เข้ากัน และปั่นที่ 250 g นาน 10 นาที ที่ 22 °C เก็บส่วนบน (platelet rich plasma, PRP) ปั่นล้างที่ 1,500 g นาน 5 นาที ด้วย 0.5% BSA- NaN_3 -PBS นับเกล็ดเลือดโดยน้ำยา Rees-Ecker และปรับความเข้มข้น เกล็ดเลือดเป็น 1×10^7 เกล็ดเลือดต่อมิลลิลิตร จากนั้น block Fc receptor โดยการเติม 20% AB serum ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ก่อนที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในหลอดทดลองโดยวิธี Indirect immunofluorescent staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์

เพื่อตรวจหาเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในหลอดทดลอง ทำโดยศึกษาการแสดงออกของ P-selectin (CD62P) ดังนั้นเติมเกล็ดเลือดความเข้มข้น 1×10^7 เกล็ดเลือดต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรในหลอดทดลอง ย้อมกับ mouse anti human CD62P (Santa Cruz) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาดำยด้วย 0.5 % BSA- NaN_3 -PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม FITC-conjugated sheep F(ab')₂ anti-mouse immunoglobulins antibody (Chemicon)

ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มีด ปั่นล้างด้วย 0.5 % BSA- NaN_3 -PBS จำนวน 2 ครั้ง เติมน้ำ 20% normal mouse serum ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ในที่มีด เมื่อครบเวลาเติมน้ำ mouse anti-human CD42b R-PE (Biolegend) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ในที่มีด ครบเวลาทำการ ปั่นล้างด้วย 0.5 % BSA- NaN_3 -PBS จากนั้นเติม 1% PFA ปริมาตร 350 ไมโครลิตร วิเคราะห์ผลการย้อมด้วยเครื่องฟลูออโรไซโตมิเตอร์ (FACSCalibur, Becton Dickinson)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำเสนอข้อมูลเป็นค่า mean±standard error of mean และความแตกต่างของเกล็ดเลือดที่มีการแสดงออกของ P-selectin (CD62P) จากตัวอย่างเลือดที่ใช้สารกันเลือดแข็งต่างชนิดกัน และการตรึงและไม่ตรึงเกล็ดเลือดด้วย PFA มาเปรียบเทียบโดยใช้ Wilcoxon signed-rank test ที่นัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้บริจาคสุขภาพดีจำนวน 9 รายใส่สารกันเลือดแข็งชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาการกระตุ้นของเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง โดยตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของ P-selectin (CD62P) ด้วยวิธี indirect immunofluorescent staining และ flow cytometry โดยแบ่งกลุ่มของตัวอย่างเลือด ตามชนิดของสารกันเลือดแข็ง 4 ชนิดคือ CTAD, CTAD+citric acid, 3.2% sodium citrate และ EDTA ผลการศึกษาพบว่า เกล็ดเลือดเกิดการกระตุ้นภายในหลอดทดลองเท่ากับ 34.01%, 34.24%, 62.0% และ 42.37% ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1) ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างเลือดออกเป็นกลุ่มที่มีการเติม และกลุ่มที่ไม่มีการเติม 4% PFA ซึ่งพบว่า กลุ่มของตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งที่มีการเติม 4% PFA ลงไปนั้น มีปริมาณการเกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือดในหลอดทดลองน้อยกว่า ตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งและไม่เติม paraformaldehyde (รูปที่ 2) นอกจากนี้ยังพบว่า สารกันเลือดแข็งชนิด CTAD ที่มี citric acid เป็น

ส่วนประกอบ ร่วมกับการเติม paraformaldehyde เพื่อตรึงเกล็ดเลือด สามารถป้องกันการกระตุ้นของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้ดีที่สุดคือ มีเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นน้อยที่สุด เท่ากับ $2.37 \pm 0.72\%$ รองลงมาคือ สารกันเลือดแข็งชนิด K_3EDTA มีเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น $4.27 \pm 1.86\%$ ถัดมา คือ 3.2% sodium citrate มีเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น $4.92 \pm 2.09\%$ ส่วนสารกันเลือดแข็งชนิด CTAD ที่ไม่มี citric acid เป็นส่วนประกอบ นั้นสามารถยับยั้งการกระตุ้นของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้น้อยที่สุด คือมีเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นเท่ากับ $5.73 \pm 1.84\%$ แต่อย่างไรก็ตาม การใช้สารกันเลือดแข็งทั้ง 4 ชนิดร่วมกับการเติม paraformaldehyde สามารถ

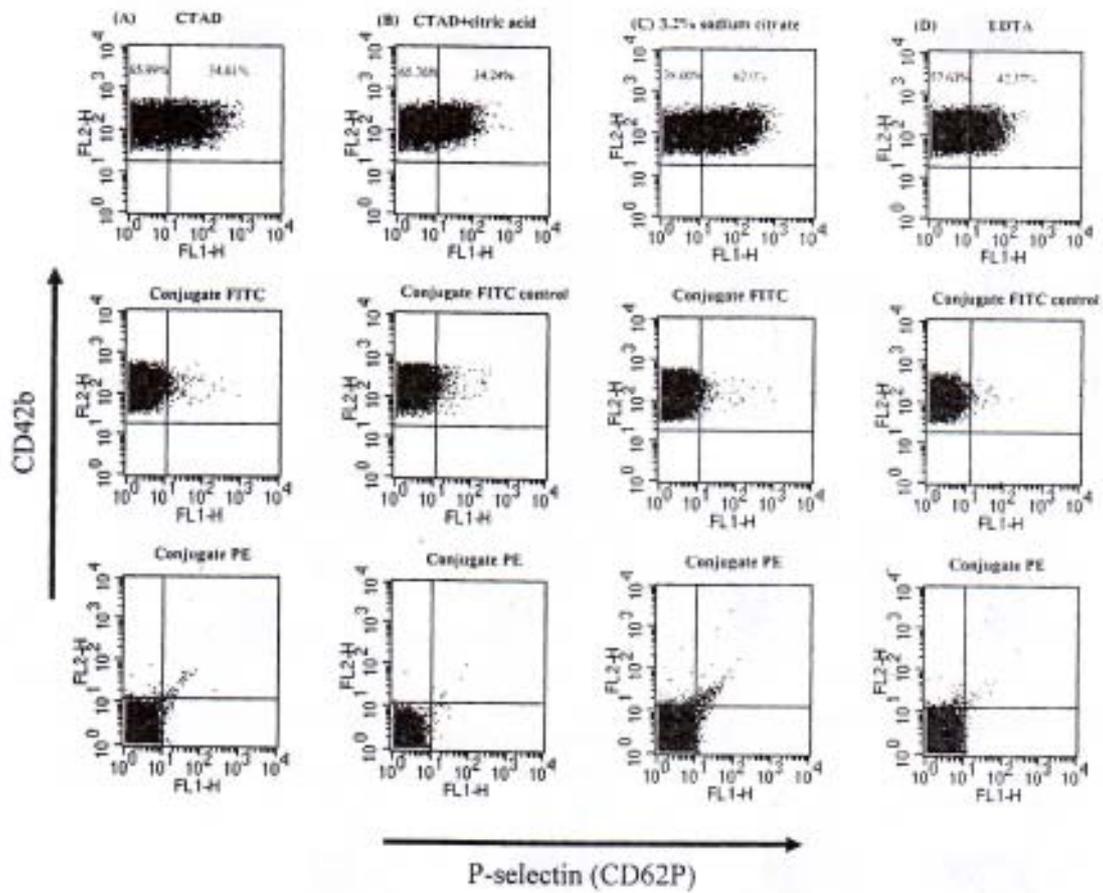
ป้องกันการกระตุ้นของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 3) สำหรับสารกันเลือดแข็งในกลุ่มที่ไม่มีสารเติม 4% paraformaldehyde นั้น พบว่าสารกันเลือดแข็งชนิด CTAD, CTAD ที่มีส่วนผสมของ citric acid, 3.2% sodium citrate และ K_3EDTA มีเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น $34.01 \pm 5.71\%$, $34.24 \pm 5.13\%$, $62.00 \pm 3.55\%$ และ $42.37 \pm 6.72\%$ ตามลำดับ (รูปที่ 3) โดยพบว่าสารกันเลือดแข็ง CTAD และ CTAD+citric acid สามารถป้องกันการกระตุ้นของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้แตกต่างกับการใช้สารกันเลือดแข็ง 3.2% sodium citrate อย่างมี นัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเกล็ดเลือดที่มีการแสดงออกของโมเลกุล CD62P จากการใช้สารกันเลือดแข็งชนิดต่าง ๆ^a

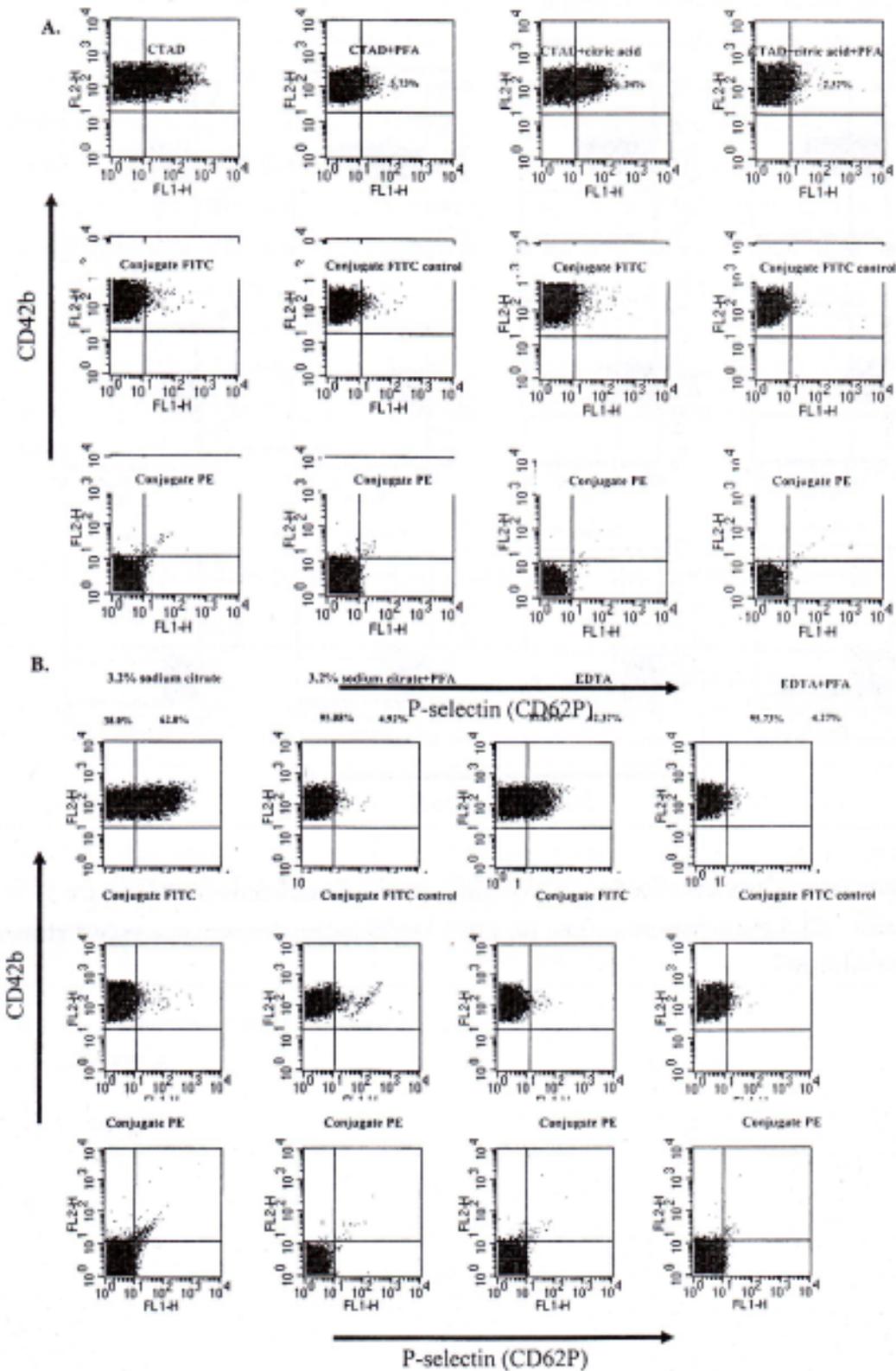
ชนิดของสารกันเลือดแข็ง	% mean platelet CD62P expression	
	ไม่เติม paraformaldehyde	เติม paraformaldehyde
1. CTAD	$34.01 \pm 5.71\%$	$5.73 \pm 1.84\%$
2. CTAD+citric acid	$34.24 \pm 5.13\%$	$2.37 \pm 0.72\%$
3. Sodium citrate	$62.00 \pm 3.55\%$	$4.92 \pm 2.09\%$
4. K_3EDTA ^b	$42.37 \pm 6.72\%$	$4.27 \pm 1.86\%$

^aMean (\pm SE) จากการศึกษิตัวอย่างเลือดจำนวน 9 ราย

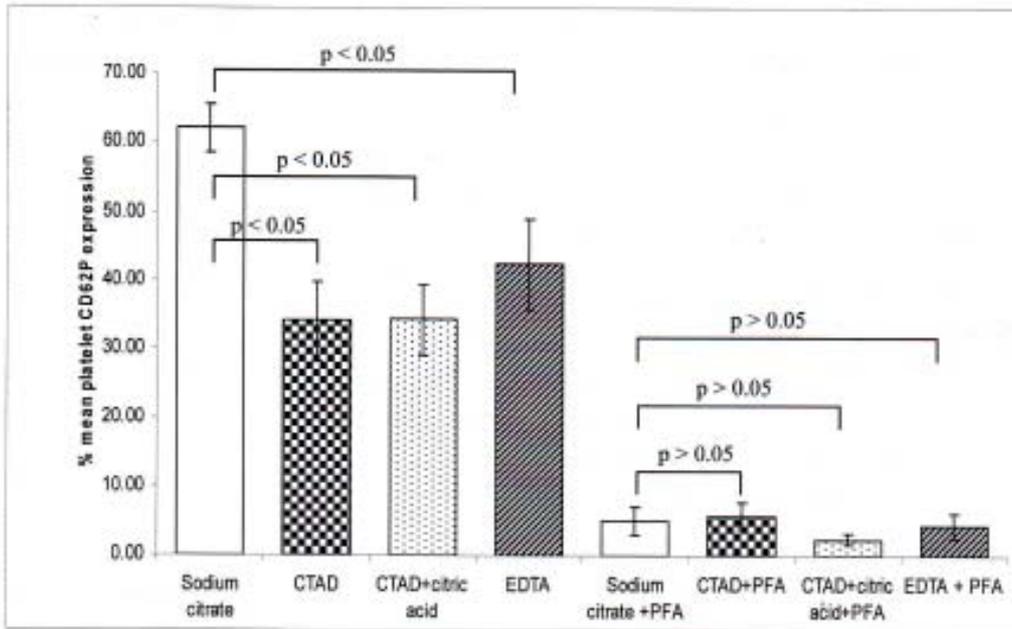
^bTripotassium EDTA



รูปที่ 1 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยสารกันเลือดแข็งชนิด (A) CTAD, (B) CTAD + citric acid, (C) 3.2% sodium citrate และ (D) EDTA โดยวิธี indirect immunofluorescent staining และฟลูออโรไซโตเมตรี



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นตัวอย่างเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิด CTAD, CTAD+citric acid, 3.2% sodium citrate, EDTA โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อยแบบไม่เติม paraformaldehyde (A) และเติม paraformaldehyde (B) โดยวิธี indirect immunofluorescent staining และฟลูออโรไซโตเมตรี



รูปที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์เกล็ดเลือดที่มีการแสดงออกของโมเลกุล P-selectin (CD62P) จากตัวอย่างเลือดเลือดที่เก็บในสารกันเลือดแข็งชนิดต่าง ๆ ร่วมกับการเติมและไม่เติม paraformaldehyde โดยวิธี indirect immunofluorescent staining และโฟลไซโตเมตรี

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์การแสดงออกของโมเลกุลที่ผิวเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยโมโนโคลนอล แอนติบอดีที่จำเพาะโดยวิธีโฟลไซโตเมตรี เป็นวิธีที่นิยมมากในการตรวจหาเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในร่างกายเพื่อใช้บ่งชี้การเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน อย่างไรก็ตามสิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการตรวจโดยวิธีนี้คือ การป้องกันการเกิดการกระตุ้นของเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นเองในหลอดทดลอง (spontaneous *in vitro* platelet activation) มีรายงานเกี่ยวกับการลดกระบวนการดังกล่าว สามารถทำได้โดยรีบเจือจางเลือดเพื่อเพิ่มระยะห่างของเซลล์ การเติม antagonist หรือการตรึงเซลล์ (fixation) ทั้งนี้ ส่วนสารกันเลือดแข็งก็มีบทบาทเช่นกัน โดยทั่วไปการตรวจวัดเกล็ดเลือดนิยมเก็บตัวอย่างเลือดใน citrate และต้องทำภายใน 10 นาที ทั้งนี้ยังมีข้อควรระวังในเรื่องอัตราส่วนของสารกันเลือดแข็งกับปริมาณของเลือด และข้อจำกัดในเรื่องการควบคุม osmolarity ของสารกันเลือดแข็งชนิดดังกล่าว

ซึ่งมีผลต่อการทดสอบหน้าที่ของเกล็ดเลือดได้ สำหรับ K_3EDTA ที่ใช้เป็นสารกันเลือดแข็ง ที่จับกับ Ca^{2+} ไม่นิยมใช้ในการตรวจหาเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น เนื่องจากมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ GPIIb/IIIa ดังนั้น สารกันเลือดแข็งชนิดนี้จึงเหมาะสำหรับใช้ในการนับจำนวนของเกล็ดเลือดเท่านั้น^{10,11} ตัวอย่างเลือดที่เก็บใน Diatube-H (CTAD) มีรายงานว่า สามารถลดการเกิด spontaneous platelet activation ได้ดีที่สุดใน เนื่องจากมีส่วนผสมของ citrate ซึ่งทำหน้าที่ในการจับกับ Ca^{2+} ได้อย่างรวดเร็ว Adenosine ทำหน้าที่กระตุ้น membrane adenylyate cyclase ส่วน theophylline และ Dipyridamole ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของ adenosine 3'5'-monophosphate (cAMP) phosphodiesterase^{8,9} จากรายงานการวิจัยพบว่าองค์ประกอบที่อยู่ในสารกันเลือดแข็งชนิด CTAD นั้นมีคุณสมบัติที่ดีและเหมาะสมในการยับยั้งการกระตุ้นเกล็ดเลือด และแนะนำให้ใช้ CTAD สำหรับเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูก

กระตุ้นในร่างกาย^{8,9,12} นอกจากนี้ การใช้สารเคมี (additive fixation) ที่ช่วยในการตรึง และรักษารูปร่างของเซลล์ให้คงรูป ร่วมกับการใช้สารกันเลือดแข็งที่เหมาะสม จะช่วยเสริมการยับยั้งการกระตุ้นของเกล็ดเลือดได้ดีขึ้นอีกด้วย สารที่ใช้ในการคงสภาพของเซลล์มีหลายชนิด PFA เป็นหนึ่งตัวอย่างที่นิยมนำมาใช้ในยับยั้งการกระตุ้นของเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการกระตุ้นของเกล็ดเลือดระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ใช้สารกันเลือดแข็งที่มีการเติม และไม่เติม PFA พบว่ากลุ่มที่มีการเติม PFA ร่วมกับสารกันเลือดแข็งนั้นมีการแสดงออกของ P-selectin น้อยกว่าเกล็ดเลือดในกลุ่มที่ไม่ได้เติมสาร^{12,13} แสดงให้เห็นว่า PFA มีคุณสมบัติในการยับยั้งการกระตุ้นของเกล็ดเลือดได้ โดยทำให้เกิด covalent-link ระหว่าง กรดอะมิโน หรือโปรตีน ซึ่งสามารถตรึงและรักษารูปร่างของเซลล์ได้โดยไม่ทำลายเซลล์เหมือนสารเคมี ชนิดอื่นเช่น acetone-methanol ซึ่งเป็น denaturing fixation¹⁴ นอกจากนี้ PFA ยังเหมาะสำหรับใช้ในการคงสภาพของเซลล์ ในกรณีการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้เวลานานเกินกว่า 2 ชั่วโมง เช่น การย้อมเซลล์หรือเกล็ดเลือดด้วยวิธี immunofluorescent staining และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer ซึ่งวิธีนี้ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์ค่อนข้างนาน จะเห็นได้ว่า PFA เป็นสารที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ร่วมกับสารกันเลือดแข็งเพื่อตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในร่างกายได้

จากการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถผลิตสารกันเลือดแข็งชนิด CTAD ได้และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการกระตุ้นของเกล็ดเลือดที่เกิดจากขั้นตอนการเจาะเลือดและการเก็บสิ่งส่งตรวจ พบว่า CTAD ที่มี citric acid เป็น ส่วนประกอบสามารถป้องกันการกระตุ้นเกล็ดเลือดที่เกิดจากเทคนิคดังกล่าวได้ดีกว่าสารกันเลือดแข็ง 3.2% sodium citrate และ K₃EDTA โดยต้องมีการเติม fixation คือ 4% PFA ลงไปด้วย ซึ่งทำให้สามารถรายงานค่าของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated platelet) ที่มีอยู่จริงภายในร่างกายได้อย่างถูกต้อง เพื่อให้เกิดประโยชน์สำหรับการตรวจวินิจฉัยประกอบการรักษาและป้องกันผู้ป่วยจากการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันได้ สารกันเลือดแข็งชนิด CTAD ที่เตรียมขึ้นใช้เองนี้มี

ราคาถูกกว่าการสั่งซื้อ จากต่างประเทศมาก ดังนั้น CTAD จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นในงานประจำของโรงพยาบาล เนื่องจากสามารถเตรียมใช้เองในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาวิจัยว่าตัวอย่างเลือดที่ใช้ CTAD เป็นสารกันเลือดแข็งนั้นสามารถที่จะนำมาใช้ตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการชนิดอื่นได้ด้วยเช่น การตรวจทางเคมีคลินิก ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างจากการตรวจในซีรัม¹⁵ แสดงให้เห็นว่า CTAD เป็นสารกันเลือดแข็งอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ ในการนำมาใช้เตรียมตัวอย่างเลือดสำหรับตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ทุนงบประมาณแผ่นดิน สภาวิจัยแห่งชาติ ปี 2550) และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดสำหรับการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007; 357: 2482-94.
2. Rodvien R, Mielke CH, Jr. Role of platelets in hemostasis and thrombosis. *West J Med.* 1976; 125: 181-6.
3. Kilickiran Avci B, Oto A, Ozcebe O. Thrombocytopenia associated with antithrombotic therapy in patients with cardiovascular diseases: diagnosis and treatment. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2008; 8: 327-39.
4. Kereiakes DJ, Essell JH, Abbottsmith CW, Broderick TM, Runyon JP. Abciximab-associated profound thrombocytopenia: therapy with immunoglobulin and platelet transfusion. *Am J Cardiol.* 1996; 78: 1161-3.
5. Billheimer JT, Dicker IB, Wynn R, et al.

- Evidence that thrombocytopenia observed in humans treated with orally bioavailable glycoprotein IIb/IIIa antagonists is immune mediated. *Blood*. 2002; 99: 3540-6.
6. Seiffert D, Stern AM, Ebling W, et al. Prospective testing for drug-dependent antibodies reduces the incidence of thrombocytopenia observed with the small molecule glycoprotein IIb/IIIa antagonist roxifiban: implications for the etiology of thrombocytopenia. *Blood*. 2003; 101: 58-63.
 7. George JN, Thoi LL, Morgan RK. Quantitative analysis of platelet membrane glycoproteins: effect of platelet washing procedures and isolation of platelet density subpopulations. *Thromb Res*. 1981; 23: 69-77.
 8. Macey M, McCarthy D, Azam U, Milne T, Golledge P, Newland A. Ethylenediaminetetraacetic acid plus citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (EDTA-CTAD): a novel anticoagulant for the flow cytometric assessment of platelet and neutrophil activation ex vivo in whole blood. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003; 51: 30-40.
 9. Ahnadi CE, Sabrinah Chapman E, Lepine M, et al. Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the Advia 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy. *Thromb Haemost*. 2003; 90: 940-8.
 10. Neufeld M, Nowak-Gottl U, Junker R. Citrate-theophylline-adenine-dipyridamol buffer is preferable to citrate buffer as an anticoagulant for flow cytometric measurement of platelet activation. *Clin Chem*. 1999; 45: 2030-3.
 11. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost*. 1998; 79: 885-96.
 12. Macey M, Azam U, McCarthy D, et al. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin Chem*. 2002; 48: 891-9.
 13. Hu H, Daleskog M, Li N. Influences of fixatives on flow cytometric measurements of platelet P-selectin expression and fibrinogen binding. *Thromb Res*. 2000; 100: 161-6.
 14. St-Laurent J, Boulay ME, Prince P, Bissonnette E, Boulet LP. Comparison of cell fixation methods of induced sputum specimens: an immunocytochemical analysis. *J Immunol Methods*. 2006; 308: 36-42.
 15. Yokota M, Tatsumi N, Tsuda I, Nishioka T, Takubo T. CTAD as a universal anticoagulant. *J Autom Methods Manag Chem*. 2003; 25: 17-20.