

นิพนธ์ต้นฉบับ

หลักฐานการถูกกระตุ้นของผนังด้านในหลอดเลือดที่พบในน้ำเหลือง
ของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียในโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่

ยุทธนา หมั่นดี*, ธฤต นาคสวัสดิ์** และ สิงห์คำ ธิมา*

บทคัดย่อ

การถูกกระตุ้นของผนังด้านในหลอดเลือดคาดว่าจะเกิดขึ้นได้ในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียโดยเฉพาะผู้ที่ได้รับการดัดม้ามแล้ว ระดับของการถูกกระตุ้นดังกล่าวสามารถตรวจวัดได้อย่างง่ายดาย โดยการตรวจวัดระดับของ endothelial activation markers ในน้ำเหลืองทั้งชนิดซีรัมและพลาสมา ชุดน้ำยาตรวจหา markers บางชนิดดังกล่าวมีวางจำหน่ายแล้ว ซึ่งอาศัยหลักการ sandwich enzyme immuno assay (EIA) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจวัดระดับของ endothelial activation markers ในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคเลือดที่มีร่างกายแข็งแรงดีตามปกติ markers ที่ใช้ศึกษามีทั้งชนิดที่จำเพาะ คือ soluble endothelial selectin (sE-selectin) และชนิดที่ไม่จำเพาะ คือ soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีระดับการแสดงออกสูงขึ้นมาก ในระหว่างการถูกกระตุ้นของผนังด้านในหลอดเลือด ซึ่งจะสามารถตรวจวัดได้ในน้ำเหลือง ได้ทำการตรวจวัดระดับของ sE-selectin และ sVCAM-1 โดยวิธี sandwich EIA ในน้ำเหลืองควบคุมจาก ผู้บริจาคเลือดที่มีร่างกายแข็งแรงดีตามปกติ 20 ราย และในน้ำเหลืองจากผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมีย 20 ราย ที่เข้ามาบริจาคเลือดหรือ เข้ามารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2544 ถึง มกราคม พ.ศ. 2545 พบว่าค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ sE-selectin และ sVCAM-1 ในตัวอย่างควบคุม เท่ากับ 25 ± 10 และ 542 ± 85 ng/mL ตามลำดับ และในผู้ป่วย เท่ากับ 110 ± 54 และ $1,559 \pm 859$ ng/mL ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) จากผลการตรวจพบนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การถูกกระตุ้นของผนังด้านใน หลอดเลือดเกิดขึ้นจริงในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมีย และชี้ให้เห็นว่าการถูกกระตุ้นของผนังด้านในหลอดเลือดนี้ น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อ อาการแสดงของโรคเบาธาลัสซีเมีย วารสารเทคนิคการแพทย์ 2548; 38: 124-129.

คำรหัส: เบาธาลัสซีเมีย, การถูกกระตุ้น, ผนังด้านในหลอดเลือด, sE-selectin, sVCAM-1

* แผนกวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

** นักศึกษาเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 4 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2544-45

* ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: yuttana@chiangmai.ac.th หรือ myuttana@hotmail.com

Abstract : Evidence of endothelial activation in β -thalassemic plasma obtaining from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital

Yuttana Mundee*, Tarit Naksawat** and Singkome Tima*

Endothelial activation is predicted in β -thalassemia especially in the patients who have undergone splenectomy. The degree of such activation can easily be examined by measure the levels of endothelial activation markers in the serum or plasma. Some commercial test kits for endothelial activation marker are available using sandwich enzyme immuno assay (EIA) as the principle. This study aims to examine the degree of endothelial activation in patients with β -thalassemia comparing with normal healthy control subjects. The specific endothelial activation markers assayed was soluble endothelial selectin (sE-selectin) and the non-specific markers was soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1). These markers were highly expressed during endothelial activation and detectable in the serum or plasma. Twenty control and 20 β -thalassemia plasma obtaining from Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, during December 2001 to January 2002 were determined using commercial test kits. The mean $\pm$ standard deviation (SD) of sE-selectin and of sVCAM-1 in control plasma were 25 ± 10 and 542 ± 85 ng/mL respectively and in β -thalassemia plasma were 110 ± 54 and $1,559 \pm 859$ ng/mL respectively. This was highly significant difference ($p < 0.001$). The finding showed a clear evidence of endothelial activation in patients with β -thalassemia and also indicated that endothelial activation might play an important role in the clinical presentations of β -thalassemia syndromes. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2005; 38: 124-129.

Key words: β -Thalassemia, Activation, Endothelium, sE-selectin, sVCAM-1

* Branch of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University 50200, Thailand.

** Forth year medical technology student, Chiang Mai University, academic year 2001-02.

* Correspondent E-mail: yuttana@chiangmai.ac.th or myuttana@hotmail.com

บทนำ

Thrombosis และ thromboembolism เป็นสาเหตุการตายที่อาจพบได้ในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (β -thalassemia major)¹⁻² เนื่องจากมีเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated platelets) ในกระแสเลือดสูงกว่าปกติ³⁻⁴ การถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือด (platelet activation) อาจเกิดจากปัจจัยบนเม็ดเลือดแดง (erythrocytes) เช่น การเผย phosphatidylserine (PS) ออกสู่ผิวนอก⁵⁻⁶

ปัจจัยในพลาสมา (plasma) เช่น การกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด (coagulation) จนได้ thrombin ซึ่งสามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดได้⁷⁻⁸ และปัจจัยในเกล็ดเลือดเอง เช่น สารเคมีที่หลั่งออกมาจากเกล็ดเลือดตัวอื่นๆ ที่ถูกกระตุ้นไปก่อนหน้านั้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังภายในหลอดเลือด (vascular endothelial cells) ตามมา⁹⁻¹⁰ ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นผลมาจากความไม่สมดุลของการผลิตโกลบิน (globin chain imbalance) จากความผิดปกติทาง

พันธุกรรม ที่มียีนควบคุมการสร้าง β -globin ผิดปกติไป ทำให้มีการสร้างน้อย ในขณะที่ยีนควบคุมการสร้าง γ -globin ปกติดี จึงมีโกลบินชนิดหลังนี้เหลือมากเกินไป แล้วไปสะสมอยู่ในเม็ดเลือดแดงและไม่เสถียร เมื่อมีสภาวะ oxidative stress หรือมีเหล็กเกิน¹¹ จะทำให้เกิดการชำรุดของผนังเม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงนั้นๆ แตกออกเป็นส่วนใหญ่เล็กๆ (erythrocyte microvesicles) แล้วยังทำให้ phosphatidylserine ซึ่งปกติจะอยู่ด้านในของผนังเม็ดเลือดแดง เผยออกมาอยู่ด้านนอก ทั้งในเม็ดเลือดแดงเอง ส่วนย่อยของเม็ดเลือดแดง และในเกล็ดเลือด

Phosphatidylserine ที่เผยออกสู่ด้านนอกของเซลล์นี้ สามารถกระตุ้นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดได้ ทำให้เกิด prothrombinase complex (FVa-FXa-fibrinogen) ที่สามารถย่อย prothrombin ให้เป็น thrombin ได้ ซึ่ง thrombin สามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดได้โดยตรง¹² ส่วนเม็ดเลือดแดง และส่วนย่อยของเม็ดเลือดแดง รวมทั้งเกล็ดเลือดที่มีผนังเซลล์ชำรุด จะถูกจับกินและย่อยสลายไปโดย macrophages ใน reticuloendothelial system เช่นตับและม้าม เป็นต้น ทำให้ตับม้ามโต (hepato-splenomegaly) และ เลือดจาง (anemia) เมื่อมีเลือดจางและเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง จึงมีการทำลายเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดมาก ทำให้มีการเร่งสร้างเม็ดเลือดแดงและเกล็ดเลือดอยู่ตลอดเวลา (accelerated erythropoiesis และ thrombopoiesis) จึงพบทั้งเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (reticulocytes) และเกล็ดเลือดตัวอ่อน (reticulated platelets) สูงมากกว่าปกติ จะเห็นได้ว่าระดับการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดและเซลล์เยื่อบุผนังภายในหลอดเลือดภายในร่างกาย มีความสำคัญต่ออาการทางคลินิกของผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง¹²⁻¹³

การศึกษานี้จึงมุ่งจะพิสูจน์ว่า มีการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังภายในหลอดเลือด ในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจริง เพื่อยืนยันผลที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้⁹⁻¹⁰ โดยการใช้เทคนิคทางภูมิคุ้มกันวิทยา คือ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ enzyme immuno assay (EIA) ในการตรวจวัดระดับของ endothelial activation markers 2 ชนิด ได้แก่ soluble E-selectin (sE-Selectin) และ soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) ซึ่งเป็น markers ที่

specific และ non-specific ต่อ vascular endothelial cells ตามลำดับ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก และน่าเชื่อถือ ถึงแม้จะต้องใช้ commercial test kit ที่มีราคาแพงก็ตาม

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเลือด เก็บตัวอย่างเลือดชนิด clotted blood จากผู้ป่วยโรคเลือดให้กับธนาคารเลือดจำนวน 20 ราย และจากผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงจำนวน 20 ราย ที่เข้ามาบริจาคเลือด ที่งานธนาคารเลือด หรือเข้ามารับการรักษาที่ แผนกผู้ป่วยนอก (OPD29) ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2544 ถึง มกราคม พ.ศ. 2545 โดยเก็บจากเลือดที่ทำการเจาะออกทิ้ง (blood letting) เพื่อป้องกันสภาวะ volume และ iron overload ซึ่งเป็นมาตรการปกติที่กระทำก่อนการเติมเลือดให้กับผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง เก็บรายละ 5 มิลลิลิตร ทั้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 60 นาที เพื่อให้เลือดแข็งตัวอย่างสมบูรณ์และมีการหดตัวของก้อนเลือด จากนั้นนำไปปั่นที่ 1,500 x g นาน 10 นาที แยกเก็บน้ำเหลือง (serum) แบ่งใส่หลอดพลาสติกขนาดเล็ก เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะทำการตรวจ ผู้ป่วยและผู้บริจาคเลือดได้รับฟังคำชี้แจงวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ และยินยอมให้เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อการวิจัยนี้ทุกราย

2. นำยาตรวจ sE-Selectin และ sVCAM-1 ELISA test kits ของ บริษัท R&D System, USA.

3. วิธีการตรวจ ทั้ง sE-Selectin และ sVCAM-1 ใช้วิธีการตรวจเช่นเดียวกัน ต่างกันเพียงการเจือจางตัวอย่างน้ำเหลืองก่อนการตรวจเท่านั้น โดย sE-Selectin เจือจาง 1:20 และ sVCAM-1 เจือจาง 1:50 ด้วย diluting buffer ที่ให้มาพร้อมกับชุดนำยาตรวจ วิธีการโดยย่อ คือ เจือจางตัวอย่างตรวจตามกำหนด ใส่ตัวอย่างตรวจที่เจือจางแล้ว ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน 5 ระดับ และตัวอย่างควบคุมที่มีความเข้มข้น 2 ระดับ เติม conjugate ลงไปทุกหลุม ทั้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 90 นาที ล้างออก ด้วย washing buffer ซับให้แห้ง เติม substrate solution ทั้งไว้ในอุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 30 นาที

หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 450 nm ใช้ค่าความเข้มข้นมาตรฐาน 5 ค่า กับค่า absorbance ของแต่ละความเข้มข้น ในการสร้าง standard curve นำค่า absorbance ของ control ทั้ง 2 ระดับ และของแต่ละตัวอย่าง ไปอ่านค่าความเข้มข้นจาก standard curve

4. การคำนวณทางสถิติ ใช้ parametric statistics แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย (mean) $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation of the mean, SD) ในกรณีนี้ค่าที่ตรวจวัดได้มีการกระจายตัวอย่างปกติ (normal distribu-

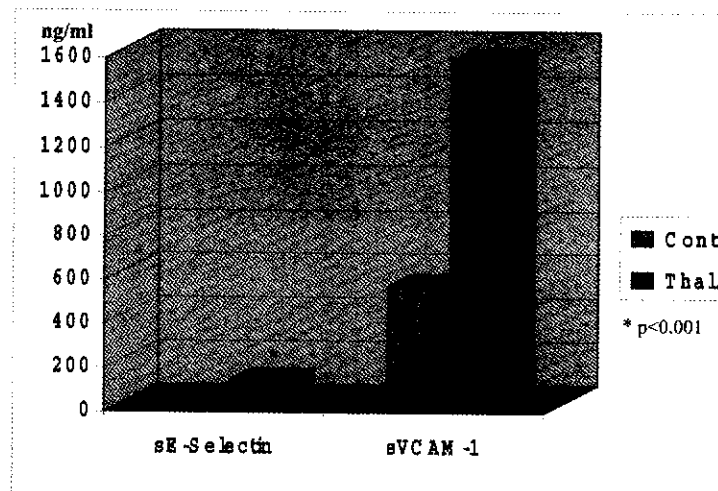
tion) โดยกำหนดค่าระดับนัยสำคัญไว้ที่ $p \leq 0.05$

ผลการทดลอง

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของ sE-selectin และ sVCAM-1 ในตัวอย่างควบคุม เท่ากับ 25 ± 10 และ 542 ± 85 ng/mL ตามลำดับ และในผู้ป่วย เท่ากับ 110 ± 54 และ $1,559 \pm 859$ ng/mL ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบระดับ sE-selectin และ sVCAM-1 ในคนปกติกับผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

กลุ่มตัวอย่าง \ ค่าการตรวจ	sE-Selectin (ng/mL)	sVCAM-1 (ng/mL)
คนปกติ (n = 20)	25 ± 10	542 ± 85
ผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (n = 20)	110 ± 54	$1,559 \pm 859$



รูปที่ 1 เปรียบเทียบระดับ sE-Selectin และ sVCAM-1 ในคนปกติกับผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง (Cont = คนปกติ, Thal = ผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง, n = 20 ทั้งสองกลุ่ม)

วิจารณ์และสรุป

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการถูกกระตุ้นของเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือดเกิดขึ้นจริงในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเนื่องจาก

ค่าระดับ endothelial activation markers ทั้งชนิด specific และ non-specific ได้แก่ sE-selectin และ sVCAM-1 ตามลำดับ ในผู้ป่วยสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญในระดับสูง ($p < 0.001$) ซึ่งช่วยยืนยัน

ผลการศึกษาของ Butthep 1997¹⁴, Kyriakou 2001⁹, Butthep 2002¹⁵ และ Butthep 2004¹⁰ ที่ได้ผลตรงกันว่ามีการกระตุ้นของเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือดในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียชนิดต่างๆ ในระดับที่ต่างๆ กัน ซึ่งเห็นว่าการถูกกระตุ้นของเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือดนี้เกิดจากการที่มี phosphatidylserine เผยออกสู่ด้านนอกของเม็ดเลือดแดง ที่มี membrane damage จากการตกตะกอนของ β -globin ที่มีมากเกินไป เกิดการกระตุ้นการแข็งตัวของเลือด มี thrombin เกิดขึ้น ไปกระตุ้นเกล็ดเลือดต่อ แล้วส่งผลให้มีการกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือดในที่สุด ซึ่งน่าจะมีความสำคัญในการเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อ thrombosis และ thromboembolism ในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมีย ดังนั้นการหามาตรการป้องกันการกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังด้านในหลอดเลือด ด้วยยาหรือด้วยวิธีการอื่นๆ น่าจะมีส่วนช่วยให้ผู้ป่วยมีอัตราเสี่ยงดังกล่าวลดลง อันจะเป็นการยกระดับคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก และภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุญาตให้ใช้วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ ที่จำเป็น ตลอดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Visudhiphan S, Ketsa-Ard K, Tumliang S, Piankijagum A. Significance of blood coagulation and platelet profiles in relation to pulmonary thrombosis in beta-thalassemia/Hb E. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1994; 25: 449-56.
2. Sumiyoshi A, Thakerngpol K, Sonakul D. Pulmonary microthromboemboli in thalassemic cases. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1992;23(Suppl 2): 29-31.
3. Stuart MJ. Platelet dysfunction in homozygous beta-thalassemia. Pediatr Res 1979;13:1345-9.
4. Rai R, Pati H, Arya LS, Saraya AK. Platelet aggregation in homozygous beta thalassaemia. Indian J Med Res 1987; 86: 61-4.
5. Borenstain-Ben Yashar V, Barenholz Y, Hy-Am E, Rachmilewitz EA, Eldor A. Phosphatidylserine in the outer leaflet of red blood cells from beta-thalassemia patients may explain the chronic hypercoagulable state and thrombotic episodes. Am J Hematol 1993; 44: 63-5.
6. Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, et al. Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. Blood 1998; 1: 3044-51.
7. Eldor A, Maclouf J, Lellouche F, Ben-Yashar V, et al. Achronic hypercoagulable state and life-long platelet activation in beta thalassemia major. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1993; 4(Suppl 1): 2-5.
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. Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Kyriakou ES, et al. Activated peripheral blood and endothelial cells in thalassemia patients. Ann Hematol 2001; 0(10): 577-83.
10. Butthep P, Nuchprayoon I, Futrakul N. Endothelial injury and altered hemodynamics in thalassemia. Clin Hemorheol Microcirc 2004; 1(4): 287-93.
11. 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; 2(6): 283-6.
12. Eldor A, Rachmilewitz EA. The hypercoagulable state in thalassemia. Blood 2002; 99: 36-43.
13. Moratelli S, De-Sanctis V, Gemmati D, et al. Thrombotic risk in thalassemic patients. J Pediatr Endocrinol Metab 1998; 11(Suppl): 3915-21.
14. Butthep P, Bunyaratvej A, Funahara Y, et al.

- Possible evidence of endothelial cell activation and disturbance in thalassemia: an in vitro study. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 8(Suppl 3): 41-148A.
15. Butthep P, Rummavas S, Wisedpanichkij R, Jindadamrongwech S, Fucharoen S, Bunyaratvej A. Increased circulating activated endothelial cells, vascular endothelial growth factor, and tumor necrosis factor in thalassemia. Am J Hematol 2002; 0(2): 100-6.