

นิพนธ์ต้นฉบับ

ความหนาแน่นและการเกาะกลุ่มของ เกร็ดเลือด จากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย

ประสิทธิ์ ชะรัตนะ ศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์ สุชาติ ราชสวัสดิ์ระ สมอง ราชวรัณณะ
และ ดำรงค์ พิชานนท์

บทคัดย่อ ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย มักจะพบ ความผิดปกติของการทำหน้าที่ของเกร็ดเลือด รายงานนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับความหนาแน่นของเกร็ดเลือด โดย Ficoll-Hypaque density gradients (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Collier), Circulating platelet aggregates : CPA (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Velaskar และ Chitre) และ ADP-induced platelet aggregation (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Born) โดยศึกษาผู้ป่วยธาลัสซีเมีย 38 ราย เป็นผู้ตัดม้าม 21 ราย ไม่ตัดม้าม 17 ราย เปรียบเทียบกับคนปกติ 31 ราย พบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียมีความหนาแน่นของเกร็ดเลือดต่ำกว่าคนปกติ และมี %CPA สูงกว่าคนปกติ และผู้ที่ตัดม้ามแล้วจะมี %CPA สูงกว่าผู้ที่ไม่ตัดม้าม นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม จะมี %platelet aggregation (ใช้ ADP 5.0 μ M เป็น สารกระตุ้น) สูงกว่าผู้ที่ไม่ตัดม้าม และคนปกติ และรูปแบบ (pattern) ของการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดจากผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ยังต่างจากของคนปกติอีกด้วย (คำรหัส : เกร็ดเลือด, ความหนาแน่น, การจับกลุ่ม, ธาลัสซีเมีย) วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ ปีที่ 24 ฉบับที่ 1 เดือนมกราคม 2534 หน้า 29-36

ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) ของนางสาวศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์ ปีการศึกษา 2532
*อาจารย์ **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ และ ***รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Abstract Platelet Density and Aggregation in Thalassemia.

Chanarat P, Wangpitakwong S, Chaisawadi S, Chaiyarasamee S and Pintanond D.

Thalassemic patients had commonly observed are abnormal of platelet function. This report is to study about platelet density by Ficoll-Hypaque density gradients (modified from Collier), Circulating platelet aggregates :CPA (modified from Velaskar and Chitre), and ADP - induced platelet aggregation (modified from Born). Thirty eight of thalassemic patients, 21 splenectomized and 17 non-splenectomized, were determined and compared with 31 normal subjects. It was found that the platelet density in thalassemic patients was lower than in normal and the percentage of CPA in splenectomized thalassemic patients is higher than in non-splenectomized and normal subjects. In addition, the percentage of platelet aggregation (using ADP 5.0 μ l as inducer) in splenectomized thalassemic patients is higher than in non-splenectomized patients and normal subjects, and pattern of platelet aggregation in thalassemia patients is different from normal. (Keyword : Platelet, density, aggregate, thalassemia) Bull Chiang Mai AMS 1991; 24: 29-36

Platelet function ในผู้ป่วย β -thalassemia major ได้มีผู้รายงานความผิดปกติของ platelet aggregate เมื่อกระตุ้นด้วย ADP, collagen, ristocetin และ epinephrine (Eldor et al, 1978) (1) ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 Hussian และคณะ (2) พบว่า 8 รายใน 18 รายของผู้ป่วย β -thalassemia major จะมีความผิดปกติของการจับกลุ่มของเกร็ดเลือดเช่นกัน ในการศึกษาของ

Eldor และ Hussian นี้เป็นการศึกษาภายนอก ร่างกาย ซึ่งพบว่ามี hyperfunction ของเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ซึ่งตรงกันข้ามกับที่ บราฟี วันจกุล และคณะ (3) ได้ศึกษาไว้เมื่อปี ค.ศ. 1981 เกี่ยวกับการทำงานของเกร็ดเลือดภายในร่างกายของผู้ป่วย β -thalassemia/Hb E disease ที่ตัดม้าม 17 ราย และไม่ตัดม้าม 17 ราย พบว่า 35% ของผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามจะมีปริมาณ circulating plate-

let aggregation (CPA) สูงกว่าคนปกติ ส่วนผู้ที่ดัดม้าม 75% จะมีปริมาณ CPA สูงกว่าคนปกติ ซึ่งพบว่าเกร็ดเลือดมี hyperfunction จนอาจสับสนได้ และจากการศึกษา CPA นี้จะพบว่า เกร็ดเลือดมีมากกว่าหนึ่งกลุ่ม คือมีพวกที่มีฤทธิ์มาก คือทำให้เกิด hyperaggregate และพวกที่ออกฤทธิ์น้อย คือเกิดการ aggregate ได้น้อย เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นให้เกร็ดเลือดมีการเกาะกลุ่ม ก็ตาม เกร็ดเลือดที่เกาะกลุ่มได้น้อยนี้อาจจะมีคุณสมบัติปกติ ในการศึกษาของ Eldor และ Hussian ซึ่งเกร็ดเลือดพวกนี้จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเกาะกลุ่มขึ้นตั้งแต่นำร่างกายแล้ว

รายงานนี้เพื่อศึกษา ความหนาแน่น, การเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด และ CPA ในผู้ป่วยเด็กธาลัสซีเมีย

วัสดุและวิธีการ

ก. กลุ่มตัวอย่าง

1. ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยได้รับการวินิจฉัย และแยกประเภทแน่นอนแล้ว จำนวน 38 ราย เป็นหญิง 14 ราย ชาย 24 ราย อายุ 3-16 ปี (เฉลี่ย 7 ปี) เป็นผู้ป่วย β -thalassemia major 37 ราย และ β -thalassemia/Hb E disease 1 ราย ผู้ป่วย β -thalassemia major นั้น ได้รับการดัดม้ามแล้ว 21 ราย

2. คนปกติ จำนวน 31 คน เป็นหญิง 8 คน ชาย 23 คน อายุ 18-25 ปี (เฉลี่ย 22 ปี)

ข. การศึกษาความหนาแน่นของเกร็ดเลือด

ศึกษาโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Collier และคณะ (*) โดยมีหลักการดังนี้ คือ เมื่อนำ platelet riched plasma (PRP) ที่ 2,000 รอบต่อนาที นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ Ficoll-Hypaque (F-H) density

gradients ต่างๆ เกร็ดเลือดจะแยกชั้นตาม gradients ของ F-H จากนั้น นำเกร็ดเลือดนั้นแต่ละความถ่วงจำเพาะมานับจำนวน น้ำค่าที่ได้มาคิดเป็นค่า relative platelet count สำหรับแต่ละราย

ทำการศึกษาค้นคนปกติ 10 ราย

ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย 12 ราย

ดัดม้าม 6 ราย

ไม่ดัดม้าม 6 ราย

เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. เครื่องปั่น Kokusan Model H-103 KS
 2. หลอดพลาสติก ขนาด 12x75 มม.
 3. ไปเปตอตันมิติ ขนาด 500 ไมโครลิตร
- น้ำยาที่ใช้ Ficoll-Hypaque ความถ่วงจำเพาะต่างๆ คือ 1.055, 1.060, 1.065, 1.070, 1.080, 1.090

วิธีการ

1. เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำจำนวน 5 มล. ใส่ลงในหลอดพลาสติก โดยมี 3.8% sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็ง (อัตราส่วนเลือด : citrate = 9:1)
2. ดูปริมาณ 20 ไมโครลิตร มาเป็นจำนวนเกร็ดเลือด โดยใช้ยา 1% ammonium oxalate
3. นำเลือดที่เหลือนำมาปั่นแยก PRP ที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ดูปริมาณที่แยกได้ใส่หลอดพลาสติก
4. นำพลาสมาที่แยกได้ไปนับจำนวนเกร็ดเลือด เช่นเดียวกับขั้นตอน 2.
5. ดูปริมาณ F-H ลงในหลอดพลาสติกขนาด 12x75 มม. โดยให้ส่วนที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.090 อยู่ชั้นล่างสุด แล้ว overlayer ด้วย F-H ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.080, 1.070, 1.065, 1.060 และ 1.055 ขึ้นมาตามลำดับ แล้วจึงใส่ PRP ขึ้นบนสุด

6. นำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 g นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
7. ำเข้าไปเปิดดูตามฉีขนาด 500 ไมโครลิตร คัด PRP ที่ปั่นแล้วแต่ละชั้นนำใส่ในหลอดพลาสติก ฉีขนาด 12x75 มม. โดยชั้นบนสุดจะเป็น

platelet poored plasma (PPP)

8. นำแต่ละส่วนของ PRP ที่แยกได้ ไปนับจำนวนเกร็ดเลือด ตามวิธีข้อ 2. นำค่าที่ได้ไปหา Relative platelet count จากสูตร

$$\text{Relative platelet count} = \frac{\text{จำนวนเกร็ดเลือดที่นับได้/ลบ.มม.}}{\text{จำนวนแต่ละส่วน} \times \text{ผลรวมของจำนวนเกร็ดเลือดที่นับได้/ลบ.มม. ของทุกส่วนรวมกัน}}$$

ค. ศึกษา Circulating platelet aggregation (CPA)

ศึกษาโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Velaska และ Chitre⁽⁵⁾ มีวิธีการดังนี้คือ smear เลือดที่เจาะจากหลอดเลือดดำบนส้นเท้า นำไปย้อมด้วย Leishman's stain จากนั้น ทำการนับ CPA ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

การนับจากกล้องจุลทรรศน์ ได้นับตามแนวตั้งฉากกับ smear โดยนับเกร็ดเลือดจำนวน 300 เซลล์⁽⁶⁾ จำแนกเป็นเกร็ดเลือดเดี่ยวๆ และเกร็ดเลือดที่เกาะกลุ่มกันตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไปถือว่าเป็น CPA

คำนวณค่าประมาณ %CPA เป็นเปอร์เซ็นต์ได้จากสูตร

$$\%CPA = \frac{\text{จำนวนเกร็ดเลือดที่เกาะกลุ่ม}}{\text{จำนวนเกร็ดเลือดที่นับ}} \times 100$$

ง. การศึกษา Platelet aggregation

ศึกษาโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Born⁽⁷⁾ มีหลักการดังนี้ คือ ำใช้ ADP เป็นตัวกระตุ้นให้เกร็ดเลือดเกิดการจับกลุ่มกัน แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ผ่านกลุ่มของเกร็ดเลือด ด้วยเครื่อง Aggregometer (Diachi รุ่น PA-3220)

น้ำยาที่ใช้

1. Adenosine 5-dihydrogenphosphate (ADP), stock solution (10 mM) เตรียมโดยชั่ง ADP (Sigma Chemical Co.) 0.017088 กรัม ละลายใน normal saline solution 4 มล. แล้วแบ่งเป็นส่วนละ 0.1 มล. เก็บไว้ที่ -20 °C
2. ADP, working solution (0.1 mM) เจือจาง stock solution 0.1 มล. ให้เป็น 10.0 มล. ด้วย normal saline solution

วิธีการ

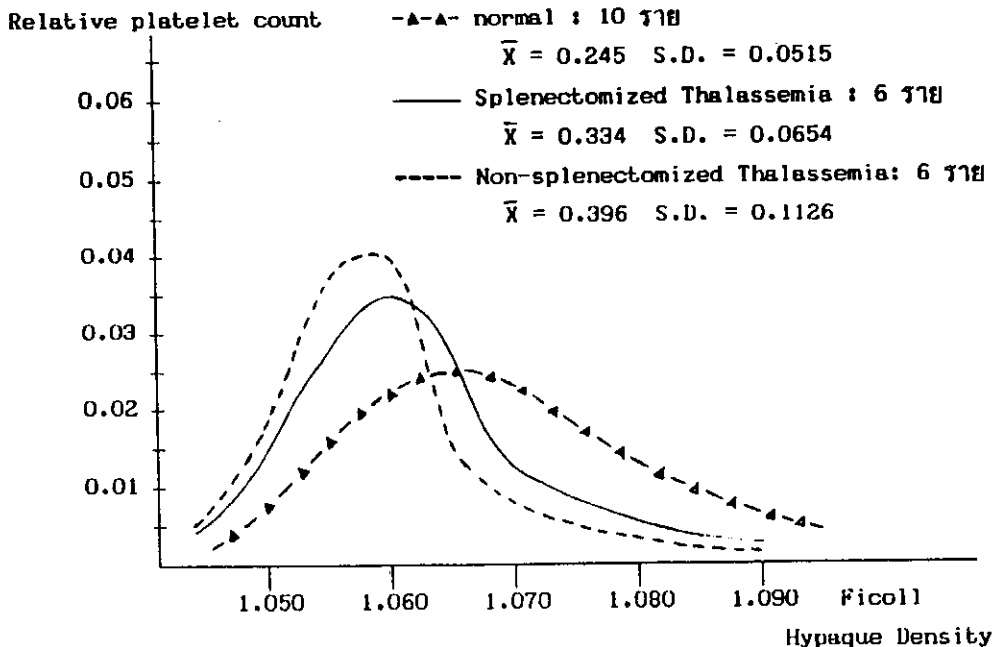
1. เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำ 10 มล. โดยำใช้ 3.8% sodium citrate เป็นสารกันเลือดแข็ง
2. นับจำนวนเกร็ดเลือด โดยำใช้ 1% ammonium oxalate
3. นำเลือดที่เหลือนมาแยกชั้น PRP ของผู้ป่วยและคนปกติ ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดเอา PRP ำใส่หลอดพลาสติกฉีขนาด 12x17 มม. โดยต้องแยก PRP ที่ได้ เป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน คือ ส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่าง โดยำให้หลอดพลาสติกขนาดเดิมบ้าง เล็กน้อย โดยดูด PRP จำนวนแต่ละส่วนลงใน

4. นำเลือดและพลาสมาจากข้อ 3. ไปปั่นต่อที่ 3,600 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เพื่อแยกเอา PPP
5. คัด PRP มานับจำนวนเกร็ดเลือด จากนั้นเจือจาง PRP ให้มีจำนวนเกร็ดเลือดประมาณ 75,000-150,000 เซลล์/ลบ.มม. ด้วย PPP ทำเช่นนี้กับ PRP ที่แยกได้ทั้ง 3 ส่วน
6. ใช้ชักกลั่นปรับอ่านค่า transmittance ซึ่งเทียบเท่ากับ 0% aggregation
7. ใช้ PPP ปรับอ่านค่า transmittance ซึ่งเทียบเท่ากับ 100% aggregation
8. เมื่อปรับเครื่อง Aggregometer เรียบร้อยแล้ว ทำการทดสอบบิตยด PRP ที่ปรับจำนวนแล้ว 0.5 มล. ใส่ในหลอดอ่านแล้วนำไปลงใน cuvette holder ที่อุณหภูมิ

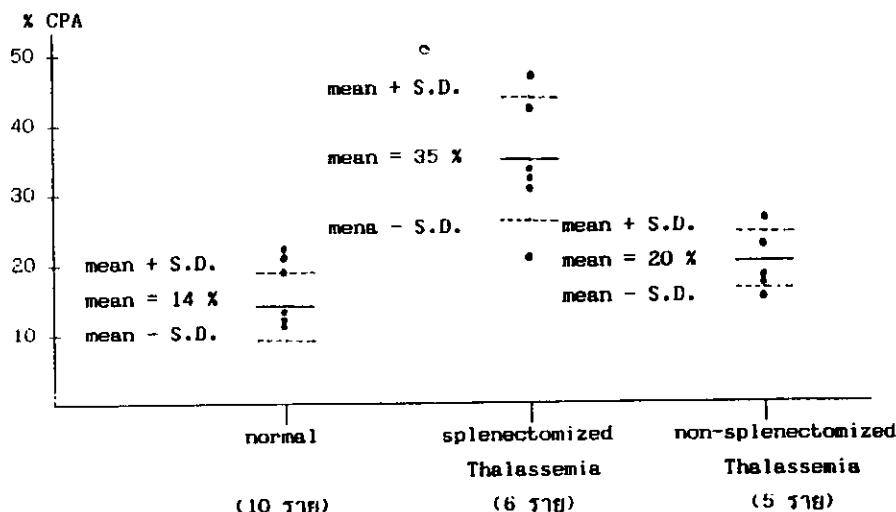
- 37°C นานประมาณ 5 นาที หลังจากได้ ADP working solution 25 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5.0 ไมโครกรัม/มล. ของ PRP
9. ใช้เครื่องบันทึกกราฟระหว่าง %Aggregation กับเวลา นาน 5 นาที หลังจากที่ได้ ADP ลงไปใน PRP แล้ว
10. ทำเช่นเดียวกับข้อ 8 และ ข้อ 9 สำหรับ PRP ที่แยกได้ทั้ง 3 ส่วน ในแต่ละราย

ผลการทดลอง

เมื่อใช้ F-H ความหนาแน่นต่างๆ ตั้งแต่ 1.055 ถึง 1.090 มาแยกเกร็ดเลือด พบว่าความหนาแน่นของเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียทั้งที่ตัดม้ามและไม่ตัดม้าม มีค่าต่ำกว่าของคนปกติ คือ ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.060 เป็นส่วนมาก ซึ่งในคนปกติ จะมีความหนาแน่น เท่ากับ 1.065 เป็นส่วนมาก (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่าง Relative platelet count กับ F-H density



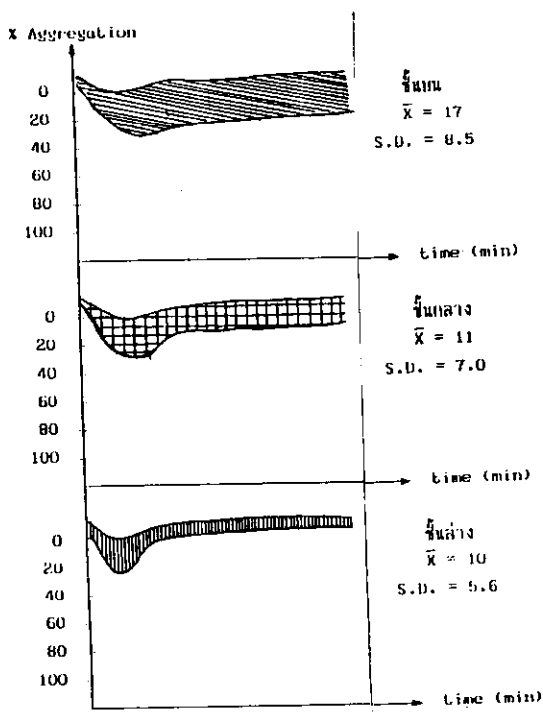
รูปที่ 2 ปริมาณ CPA ในคนปกติ, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่ตัดม้าม และไม่ตัดม้าม

เมื่อศึกษา circulating platelet aggregated (CPA) ในคนปกติ และผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่ตัด และไม่ตัดม้าม จะได้ปริมาณ CPA ($\bar{X} \pm 1SD$) เท่ากับ $14 \pm 5\%$, $35 \pm 9\%$ และ $20 \pm 4\%$ ตามลำดับ ตามรูปที่ 2

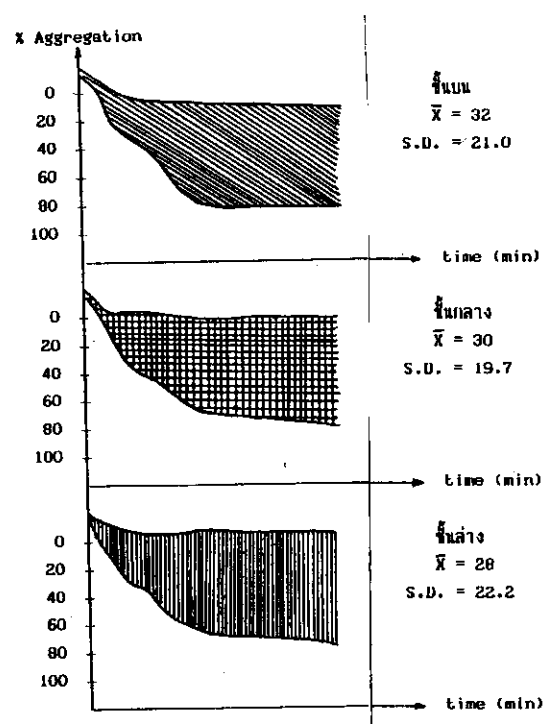
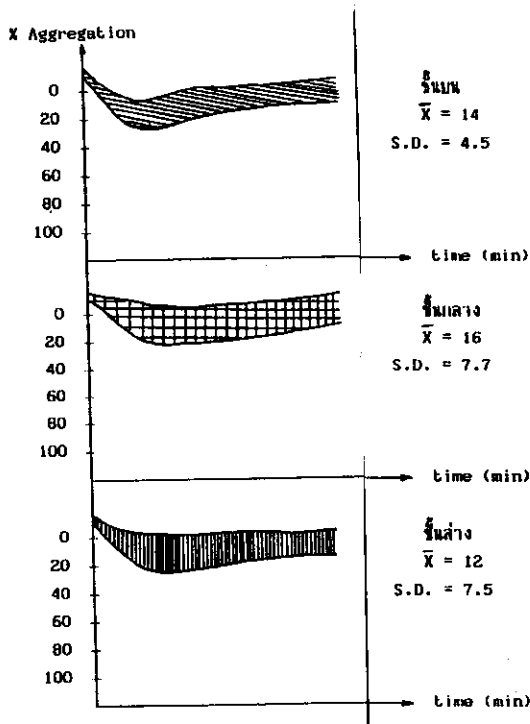
เมื่อใช้ ADP ความเข้มข้น 5.0 ไมโครโมล/ลิตร ต่อ PRP 1 มล. ในการกระตุ้นเกร็ดเลือดให้จับกลุ่มกัน ในคนปกติและผู้ป่วยธาลัสซีเมีย พบว่าในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย การจับกลุ่มของเกร็ดเลือด จะเป็นแบบ irreversible aggregation และจะมี hyperaggregation ในผู้ป่วยที่ตัดม้าม ตามรูปที่ 3-5

วิจารณ์

จากการศึกษา platelet density ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม และไม่ตัดม้าม เปรียบเทียบกับคนปกติ เมื่อใช้ F-H gradients พบว่าปริมาณ relative platelet count ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ทั้งที่ตัดม้ามและไม่ตัดม้าม นั้น จะมีความหนาแน่นต่ำกว่าคนปกติ คือปริมาณ



รูปที่ 3 Platelet aggregation ในคนปกติ 11 ราย



รูปที่ 4 Platelet aggregation ในผู้ป่วย ธาลัสซีเมียที่ไม่ได้ตัดม้ามจำนวน 6 ราย

รูปที่ 5 Platelet aggregation ในผู้ป่วย ธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม จำนวน 9 ราย

relative platelet count ของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย นั้น จะสูงที่สุดที่ ถ.พ. 1.060 ส่วนในคนปกติจะมีปริมาณสูงสุดที่ ถ.พ. 1.065 แสดงให้เห็นว่าเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย นั้น ส่วนใหญ่จะเป็นตัวอ่อน (young form) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า และมีความหนาแน่นน้อยกว่า

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ปริมาณ CPA ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม มีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้าม และผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามจะมีปริมาณสูงกว่าคนปกติ (รูปที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ในผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ตัดม้าม นั้น มีการ activate ให้เกร็ดเลือดจับกลุ่มกันจนกระแสเลือดมากกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามและคนปกติตามลำดับ ซึ่งผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ ปราณี

วิจิตร และคณะ (๖) ซึ่งอธิบายได้ว่า การที่เกร็ดเลือด มีการจับกลุ่มกันมากในผู้ป่วยที่ตัดม้าม อาจเนื่องมาจากผู้ป่วยที่ตัดม้าม นั้น มีปริมาณเกร็ดเลือดสูงกว่าคนปกติ เพราะในคนปกติ ม้ามจะทำหน้าที่เก็บเกร็ดเลือดไว้ หนึ่งในสาม ของทั้งหมดในร่างกายอย่างน้อย 2 วัน ก่อนที่จะปล่อยออกออกสู่กระแสโลหิต (๖) และหลังจากการตัดม้ามแล้ว เกร็ดเลือดที่ถูกปล่อยเข้าสู่กระแสโลหิตนั้น จะเป็นเกร็ดเลือดตัวอ่อน และ active มาก ทำให้เกาะกลุ่มกันได้มากขึ้น แต่ก็มีบางรายที่มี CPA ใกล้เคียงกับคนปกติ ซึ่งสาเหตุหนึ่งก็คือผู้ป่วยเหล่านี้ ได้รับการให้เลือดอยู่เสมอ อาจทำให้ร่างกาย สร้างแอนติบอดี ต่อกลัยโคโปรตีนบนเยื่อเซลล์ของเกร็ดเลือดได้ และกลัยโคโปรตีน

บนเยื่อเซลล์ของเกร็ดเลือดนั้น เป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกร็ดเลือดเกาะกลุ่มกัน โดยเฉพาะกลัยโคโปรตีนชนิด IIB

นอกจากนี้ ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ที่ทำการศึกษา % platelet aggregate โดยใช้ ADP เป็นสารกระตุ้นการจับกลุ่ม พบว่า ผู้ป่วยที่ตัดม้ามจะมีค่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้าม และคนปกติ

ส่วนในผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้าม จะมี platelet aggregate ใกล้เคียงกับคนปกติ แต่มีรูปแบบของการจับกลุ่มแตกต่างกัน คือ ในคนปกติจะเป็นแบบ reversible ส่วนในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย จะเป็นแบบ irreversible ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกร็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย ได้ถูกกระตุ้นมาก่อนแล้วในร่างกาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eldor และ Hussain โดยที่เกร็ดเลือดที่นำมาศึกษาด้วยวิธีนี้ มากกว่า 1 population คือ hyperfunction เมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น และมี hypofunction ซึ่งเกิดการจับกลุ่มได้น้อย แม้จะถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น แต่สำหรับในแต่ละชั้นของเกร็ดเลือดที่แยกได้นั้น จะมี %platelet aggregates ใกล้เคียงกัน

เอกสารอ้างอิง

1. Eldor A. Abnormal platelet function in β -thalassemia. Scand J Haematol 1978; 20: 447-452.
2. Hussain HA, Hutton RA, Pavlidon O, Hoffbrand AV. Platelet function in beta thalassemia major. J Clin Pathol 1979; 32: 426.
3. Winichagoon P, Fucharoen S, Wasi P. Increased circulating platelet aggregates in thalassemia. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth 1981; 12: 556-560.

4. Collier A, Watson H, Mathew HKDM, Strains L, Ludiam CA and Clarke BF. Platelet density analysis and interplatelet granule content in young insulin dependent diabetics. Diabetes 1986; 35: 1080-1084.
5. Velaskar DS and Chitre AP. A new aspect of platelet aggregation and a test to measure it. Am Soc Clin Path 1982; 77: 261-274.
6. Neerasingh S. Platelet aggregates in thalassemia. The Term paper, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, 1983.
7. Born GVR. Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 1962; 194: 927-929.
8. Isarangkura P, Pintadit P, Hathirat P, Sasanakul W. Platelet function test in thalassemia children. Birth Defects : Original Article Series 1988; 23: 395-401.

ประสิทธิ์ ชนะรัตน์, วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)
ภาควิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก
คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่