

Thesis Title Platelet Activation and Red Cell Membrane Phosphatidylserine Exposure *in vivo* and Platelet Function in β -Thalassemia Major

Author Miss Suwanna Semsri

M.S. Medical Technology

Examining Committee

Lecturer Dr. Yuttana Mundee	Chairman
Emeritus Professor Dr. Torpong Sanguansermisri	Member
Associate Professor Dr. Pramote Vanittanakom	Member
Associate Professor Dr. Punnee Butthep	Member
Assistant Professor Dr. Ruangrong Cheepsattayakorn	Member
Lecturer Dr. Pimlak Charoenkwan	Member

ABSTRACT

Thromboembolism is one of important causes of death in β -thalassemia especially with splenectomy and older age. This thesis focuses on platelet functions and platelet activation in β -thalassemia major. The aim of this study is examination causes and levels of *in vivo* platelet activation in β -thalassemia major. The indicators were as follows, platelet function by platelet aggregation test, red cell membrane phosphatidylserine (PS) exposure by flow cytometry, platelet morphology change by scanning electron microscopy (SEM), plasma levels of 2 platelet activation markers [β -thromboglobulin (β -TG) and platelet factor 4 (PF4)] by ELISA, CD63 expressing platelets by flow cytometry, co-culture between normal platelets and thalassemic red cells

or plasma to determine their ability to activate the platelets and finally the correlations among these parameters. The patients consisted of 38 β -thalassemia major and 12 β -thalassemia/Hb E, 16 patients with and 34 without splenectomy. All of blood samples were collected before transfusion. The healthy control subjects comprised of 30 healthy individuals. The levels of red blood cell parameters were significantly lower in β -thalassemic patients than in healthy subjects ($p < 0.05$). However, platelet count was significantly higher in the patients than in healthy subjects ($p < 0.05$) and that in the patients with splenectomy were significantly higher ($p < 0.05$) than non-splenectomy. Platelet functions *in vitro* of hypo-, normo-, hyper-aggregabilities were all observed in β -thalassemia. The PS exposing RBCs in β -thalassemia were significantly higher ($p < 0.05$) than those in healthy subjects and in patients with splenectomy were significantly higher ($p < 0.05$) than non-splenectomy. The platelet morphology changes observed under SEM, plasma levels of β -TG and PF4 and CD63⁺ platelets in β -thalassemia were significantly higher ($p < 0.05$) than those in healthy subjects and the good correlations were all demonstrated (all of the $r > 0.700$, $p < 0.01$). All parameters, except PF4 levels and platelet morphology changes, in patients with splenectomy were significantly higher ($p < 0.05$) than those in non-splenectomy. Furthermore, the red cells and plasma of β -thalassemia patients could stimulate normal platelets to express CD63 on their membrane as seen in co-culture experiments. All of these results indicate that the PS exposing RBCs in β -thalassemia is an important cause of platelet activation, which may lead to thrombosis later. Since the procoagulant activity of PS on outer RBC membrane can activate coagulation pathway that can further convert factor V (FVa) and FXa to be a prothrombinase complex. Then the complex can further induce thrombin generation. The thrombin is known to be able to activate the platelets directly. This is a clear evidence of *in vivo* platelet activation in β -thalassemic patients.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การกระตุ้นเกล็ดเลือดและการแสดงออกของฟอสฟาติดีลซีรีนบนผิว
ด้านนอกของผนังเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นภายในร่างกายและหน้าที่ของ
เกล็ดเลือดในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง

ชื่อผู้เขียน นางสาวสุวรรณา เสมศรี

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. ยุทธนา หมั่นดี	ประธานกรรมการ
ศาสตราจารย์ เกียรติคุณ นายแพทย์ ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ วัฒนัยธนาคม	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร. พรรณี บุครเทพ	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง เรืองรอง ชีพสัตยากร	กรรมการ
อาจารย์ แพทย์หญิง พิมพ์ลักษณ์ เจริญขวัญ	กรรมการ

บทคัดย่อ

หนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมีย คือ thromboembolism ที่มีสาเหตุมาจาก thrombosis โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีอายุมากและที่ตัดม้ามแล้ว เพื่อศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการทำงานและการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยธาลัสซีเมียเปรียบเทียบกับคนปกติ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง คือตรวจหาสาเหตุและระดับของการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง โดยใช้ตัวบ่งชี้ คือตรวจวัดการทำงานของเกล็ดเลือดด้วยวิธี platelet aggregation test ตรวจหาการแสดงออกของฟอสฟาติดีลซีรีนที่ผิวนอกของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี flow cytometry ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดโดยวิธี scanning electron microscopy ตรวจวัดระดับของ platelet activation markers 2 ชนิด คือ β -thromboglobulin (β -TG) และ Platelet factor 4 (PF4) ในพลาสมาด้วยวิธี

ELISA ตรวจวัดการแสดงออกของ CD63 บนผิวนอกของเกล็ดเลือดด้วยวิธี flow cytometry ทดสอบว่าเม็ดเลือดแดงหรือพลาสมาของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงสามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดของคนปกติในหลอดทดลองได้หรือไม่ และศึกษาความสัมพันธ์ของการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดและการแสดงออกของฟอสฟาติลซิลีรีนที่ผิวนอกของเม็ดเลือดแดงกับค่าการตรวจทางโลหิตวิทยาต่างๆ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา คือผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง 38 ราย ผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียที่มีฮีโมโกลบินอีร่วมด้วย 12 ราย ที่เจาะเลือดออกก่อนการเติมเลือด ได้รับการตัดม้ามแล้ว 16 ราย และยังไม่ได้รับการตัดม้าม 34 ราย คนปกติ 30 ราย จากการศึกษาพบว่าค่าทางโลหิตวิทยาของเม็ดเลือดแดงในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียน้อยกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่จำนวนเกล็ดเลือดในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียสูงกว่าคนปกติและผู้ป่วยที่ตัดม้ามแล้วสูงกว่าผู้ป่วยที่ยังไม่ตัดม้ามอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การทำงานของเกล็ดเลือดของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียในหลอดทดลองพบทั้งแบบ hypo-, normo- และ hyper-aggregability เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของฟอสฟาติลซิลีรีนที่ผิวนอกสูงกว่าคนปกติและผู้ป่วยที่ตัดม้ามสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นภายในร่างกายพบว่าในผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือด การหลัง β -TG และ PF4 การแสดงออกของ CD63⁺ platelets สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่า r ของความสัมพันธ์ทุกคู่ > 0.700 , $p < 0.01$) โดยค่าต่างๆดังกล่าว ในผู้ป่วยที่ตัดม้ามพบว่าสูงกว่าผู้ป่วยที่ไม่ตัดม้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ยกเว้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดและระดับ PF4 ในผู้ป่วยตัดม้ามและไม่ตัดม้ามไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) นอกจากนี้การนำเม็ดเลือดแดงและพลาสมาของผู้ป่วยมาเลี้ยงร่วมกับเกล็ดเลือดคนปกติพบว่าทั้งเม็ดเลือดแดงและพลาสมาสามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดคนปกติให้แสดง CD63 ที่ผิวด้านนอกได้มากกว่าเมื่อเทียบกับคนปกติ จากการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าการที่เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นแล้วนำไปสู่การเกิดภาวะ thrombosis มีสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือการที่เม็ดเลือดแดงของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมียมีการแสดงออกของฟอสฟาติลซิลีรีนที่ผิวนอกเป็น procoagulant ซึ่งสามารถกระตุ้น coagulation pathway และได้ Factor Va (FVa) และ FXa เป็น prothrombinase complex ไปย่อย prothrombin ให้กลายเป็น thrombin ซึ่งสามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดได้โดยตรง จากการศึกษาครั้งนี้พบหลักฐานชัดเจนที่แสดงว่ามีการกระตุ้นเกล็ดเลือดภายในร่างกายของผู้ป่วยเบาธาลัสซีเมีย