



ฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือด
และการศึกษาโมเลกุลเป้าหมายด้วยเทคนิค Molecular docking



ปริยาภรณ์ คล้ายสุวรรณ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

ปีการศึกษา 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือด
และการศึกษาโมเลกุลเป้าหมายด้วยเทคนิค Molecular docking



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์
ปีการศึกษา 2568
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วิทยานิพนธ์ เรื่อง “ฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดและการศึกษาโมเลกุล
เป้าหมายด้วยเทคนิค Molecular docking”

ของ ปรียาภรณ์ คล้ายสุวรรณ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวรรณา เสมศรี)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนึ่งฤทัย นิลศรี)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ครรชิต คงรส)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ดร.ไกร ดาวตาก)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัฒนา พัดเกตุ)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ รักษาการแทน
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดและการศึกษาโมเลกุลเป้าหมายด้วยเทคนิค Molecular docking
ผู้วิจัย	ปรียาภรณ์ คล้ายสุวรรณ
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนึ่งฤทัย นิลศรี
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2568
คำสำคัญ	สารมาติคาสโซไซไซด์, การทำงานของเกล็ดเลือด, โมเลกุลาร์ด็อกกิง

บทคัดย่อ

โรคหลอดเลือดสมอง เป็นภาวะที่เกิดจากลิ่มเลือดอุดตัน ซึ่งพบได้ในผู้สูงอายุ ผู้ป่วยมะเร็ง ภาวะอ้วน เบาหวาน ความดันโลหิตสูง และในหญิงตั้งครรภ์ ผู้ป่วยมักมีภาวะแทรกซ้อน ส่งผลให้มีความค่าใช้จ่ายและระยะเวลาเพื่อรักษาฟื้นฟูมากขึ้น ปัจจุบันยาต้านเกล็ดเลือดถูกนำมาใช้เพื่อป้องกันและลดการเกิดโรคซ้ำ อย่างไรก็ตามการใช้ยาเป็นเวลานานอาจส่งผลข้างเคียงได้ มีงานวิจัยก่อนหน้านี้พยายามศึกษาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ด้านการทำงานของเกล็ดเลือด และพบว่าสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ ในปี 2015 มีรายงานว่าสารมาติคาสโซไซไซด์จากใบบัวบกซึ่งเป็นสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ซาโปนิน มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดแต่ยังไม่ทราบถึงการทำงานเชิงลึก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดโดยวิเคราะห์ในกระบวนการเกาะกลุ่ม การเกาะติดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือด และการหดตัวของเกล็ดเลือด รวมถึงการศึกษาโมเลกุลเป้าหมายของสารมาติคาสโซไซไซด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง ผลการศึกษาพบว่าสารมาติคาสโซไซไซด์ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเกล็ดเลือด และที่ความเข้มข้น 200 และ 400 μM สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ได้โดยฤทธิ์ยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสาร นอกจากนี้ที่ความเข้มข้น 400 μM ส่งผลให้การเกาะติด การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การแผ่ขยายและการจัดเรียงโครงสร้าง cytoskeleton ของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทำการวิเคราะห์การหดตัวของลิ่มเลือดพบว่าสารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μM มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของลิ่มเลือดได้ ($p < 0.001$) ในการวิเคราะห์การจับกันระหว่างโปรตีนและลิแกนด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง พบว่าค่าพลังงานการยึดจับ (ΔG) ระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ กับสารมาติคาสโซไซไซด์และยา ticagrelor มีค่าเท่ากับ -9.0 และ -9.4 kcal/mol ตามลำดับ บ่งชี้ว่าสารมาติคาสโซไซไซด์อาจออกฤทธิ์ผ่านกลไกคล้ายกับยา ticagrelor ที่ยับยั้ง

การทำงานของโปรตีน P2Y₁₂ โดยตรง ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า สารมาติคาสโซไซด์มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นสารต้านการทำงานของเกล็ดเลือดที่อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคหลอดเลือดสมองในอนาคต



Title THE EFFECT OF MADECASSOSIDE ON PLATELET FUNCTION AND THE STUDY OF MOLECULAR TARGETS USING MOLECULAR DOCKING

Author Preeyaporn Klaisuwan

Advisor Assistant Professor Nungruthai Nilsri, Ph.D.

Academic Paper Thesis M.Sc. in Medical technology, Naresuan University, 2025

Keywords Madecassoside, Platelet function, Molecular docking

ABSTRACT

Stroke caused by thrombotic occlusion is common in elderly individuals, cancer patients, those with obesity, diabetes, hypertension, and pregnant women. Patients frequently experience complications, which consequently lead to increased healthcare costs and prolonged durations of treatment and rehabilitation. The standard treatment approach frequently employs antiplatelet drugs to prevent and reduce the recurrence of the disease. However, the antiplatelet drugs currently in use still have side effects when used long-term. Previous studies have attempted to study natural substances with antiplatelet activity and found that natural compounds of the triterpenoid can inhibit platelet aggregation. Furthermore, in 2015, it was reported that Madecassoside, a triterpenoid saponin compound from *Centella asiatica*, exhibits an inhibitory effect on platelet aggregation, but its mechanism is still unknown. This study investigated the effects of madecassoside on platelet function, including aggregation, adhesion, morphological changes, and cytoskeletal organization. In addition, molecular docking was performed to examine the interaction between madecassoside and target proteins involved in platelet activation. Madecassoside was found to be non-toxic to platelets and effectively inhibited platelet aggregation induced by ADP at concentrations of 200 and 400 μM , with the inhibitory effect increasing dose-dependently. Furthermore, at 400 μM , madecassoside significantly reduced platelet adhesion, shape change, spreading, and the rearrangement of the cytoskeleton structure on fibrinogen surfaces compared to the control group. The

analysis of clot retraction demonstrated that madecassoside at 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ markedly suppressed clot retraction ($p < 0.001$). Molecular docking analysis revealed that the binding energy (ΔG) between the P2Y_{12} receptor protein and madecassoside (-9.0 kcal/mol) was close to that of the known antiplatelet drug ticagrelor (-9.4 kcal/mol), suggesting that madecassoside may exert its action through a similar mechanism of directly inhibiting the P2Y_{12} protein. These findings support madecassoside's potential as a natural therapeutic candidate for preventing or treating thrombotic stroke.



ประกาศขอบคุณการ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยได้รับคำแนะนำ และความอนุเคราะห์จากทุกท่าน ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. หนึ่งฤทัย นิลศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุทิศส่วสละเวลาอันมีค่าด้วยความเอาใจใส่ ให้คำแนะนำ ชี้แนวทางช่วยเหลือและติดตามประเมินผลการทำงานวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้อย่างต่อเนื่อง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ครรชิต คงรส และดร. ไกร ดาวตาก อาจารย์ประจำภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้คำแนะนำและช่วยเพิ่มเติมเสนอแนะ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวรรณา เสมศรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอขอบคุณ คุณวรัญญูชญ์ ศุภสิริจรินรัชต์ นักวิชาการศึกษา (ผู้ล่วงลับ) หนึ่งบุคคลสำคัญของจุดเริ่มต้นและเป็นแสงสว่างส่องทางเพื่อได้พบอาจารย์ที่ปรึกษา ตลอดจน ขอขอบคุณ คุณพิไลพรรณ กองเทียม นักวิชาการศึกษา หน่วยบัณฑิตศึกษา สำนักเลขานุการ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาทำการวิจัย

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่านที่มีได้กล่าวมาข้างต้นนี้ด้วย ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในอนาคต

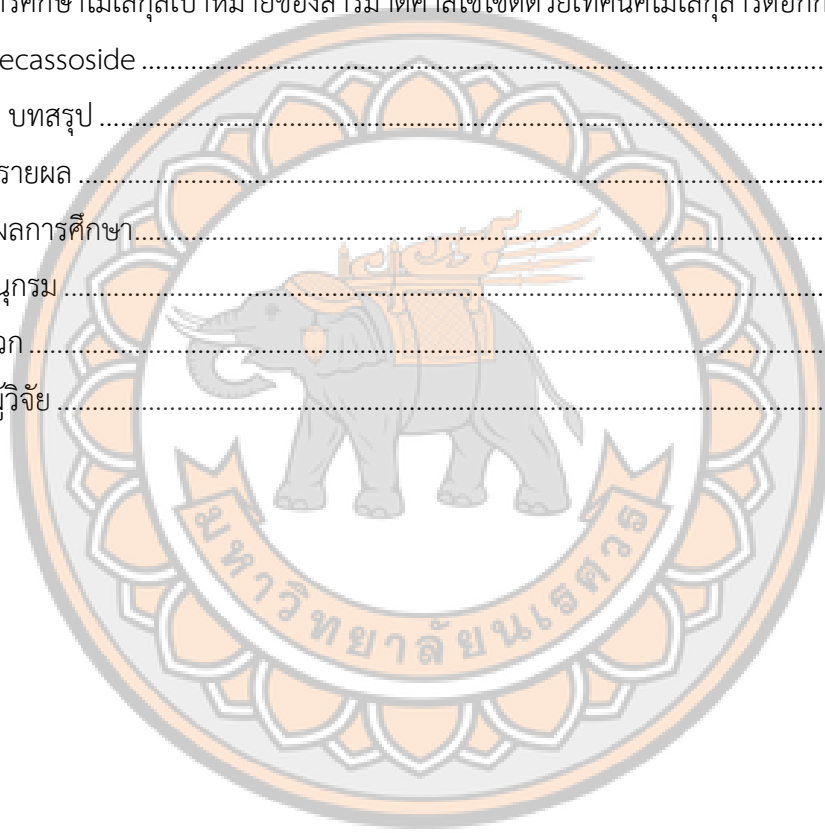
ปรียาภรณ์ คล้ายสุวรรณ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
ประกาศคุณูปการ	ช
สารบัญ	ซ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
อักษรย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตการวิจัย Conceptual framework	2
นิยามศัพท์เฉพาะ	2
สมมุติฐานของการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
โรคหัวใจและหลอดเลือด	4
เกล็ดเลือด	8
ไตรเทอร์พีนอยด์ (Triterpenoids) และบทบาทต่อการทำงานของเกล็ดเลือด	25
บัวบก	26
โมเลกุลาร์ต็อกกิง	28
เทคนิค Molecular Dynamics Simulation (MD Simulation)	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	32
วิธีดำเนินการวิจัย	32
สารมาตีคาสโซไซด์	32
การเตรียมเกล็ดเลือดสำหรับการทดสอบ	32
ทดสอบความเป็นพิษของสารมาตีคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือดด้วยการวัดปริมาณ LDH	33
ทดสอบผลของสารมาตีคาสโซไซด์ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด	33
ทดสอบผลของสารมาตีคาสโซไซด์ต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือด	34

ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการหดตัวของลิ้มเลือด.....	34
ศึกษาโมเลกุลเป้าหมายของสารมาติคาสโซไซด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง	35
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	36
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	37
ผลทดสอบความเป็นพิษของสารมาติคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือด.....	37
ผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือด.....	38
ผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการหดตัวของลิ้มเลือด.....	45
ผลการศึกษาโมเลกุลเป้าหมายของสารมาติคาสโซไซด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง	46
Madecassoside	48
บทที่ 5 บทสรุป.....	55
อภิปรายผล	55
สรุปผลการศึกษา.....	55
บรรณานุกรม.....	58
ภาคผนวก.....	67
ประวัติผู้วิจัย.....	69



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงวัตถุประสงค์ และแผนการทำงาน.....	32
ตาราง 2 แสดงผลการหัตถ์ของลิ้มเลือดและปริมาณ plasma ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO และ กลุ่มที่ได้รับสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 μ M และ 400 μ M.....	46
ตาราง 3 แสดงโครงสร้างของมาดีคาสโซไซด์และลิแกนด์ต่าง ๆ.....	48
ตาราง 4 แสดงค่าพลังงานการยึดจับของโปรตีนตัวรับบนเกล็ดเลือดและตัวยับยั้งจาก SwissDock, MA = madecassoside.....	49
ตาราง 5 Grid box ที่ใช้สำหรับการทำ โมเลกุลาร์ด็อกกิง	50
ตาราง 6 แสดงค่าพลังงานการยึดจับของโปรตีนตัวรับบนเกล็ดเลือดและตัวยับยั้งจากโปรแกรม AutoDock Vina, MA = madecassoside.....	52
ตาราง 7 แสดงโมเลกุลาร์ด็อกกิง binding energy ของโปรตีน P2Y ₁₂ กับ ลิแกนด์ต่าง ๆ.....	53



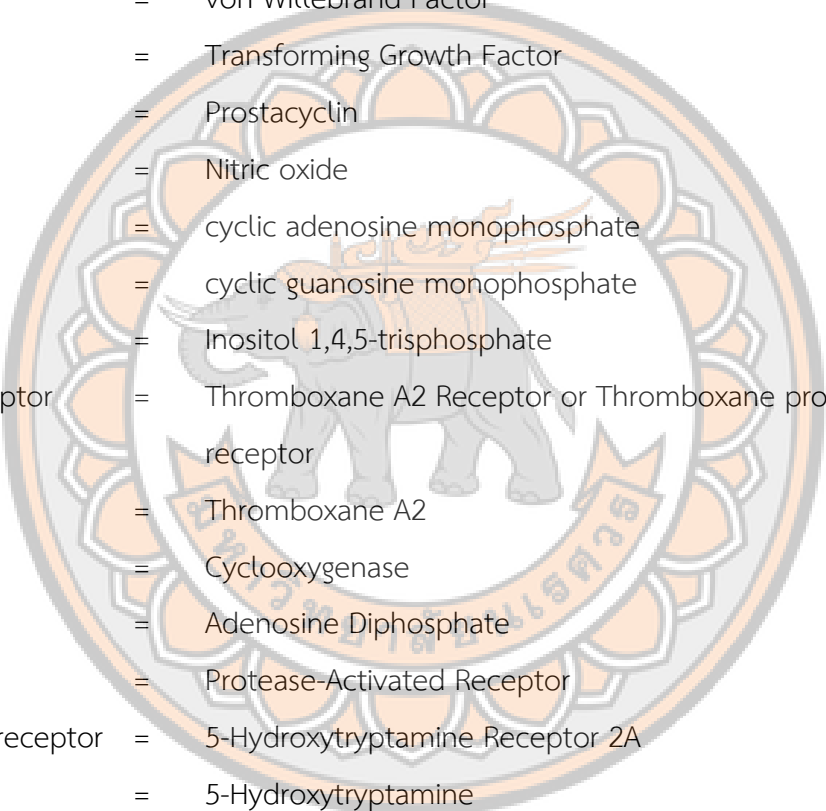
สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 แสดงขอบเขตการวิจัย.....	2
ภาพ 2 แสดงโครงสร้างเกล็ดเลือด ประกอบด้วย Peripheral Zone Structure zone Organelle zone และ Membrane zone	9
ภาพ 3 แสดงกลไกการกระตุ้นเส้นทาง PI3K/Akt โดย ADP และThrombin.....	12
ภาพ 4 แสดงการส่งสัญญาณภายหลังการกระตุ้นตัวรับ P2Y ₁₂ โดย ADP	13
ภาพ 5 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาต้าน Thromboxane.....	14
ภาพ 6 แสดงการทำงานของเกล็ดเลือด ประกอบด้วยกระบวนการเกาะติดผนังหลอดเลือด การเปลี่ยนรูปร่าง การหลั่งสาร และการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด	16
ภาพ 7 แสดงสัณฐานวิทยาของเกล็ดเลือดบ่งชี้ระดับของการกระตุ้นโดยแบ่งลำดับการเปลี่ยนแปลง เป็น 5 ระยะหลัก.....	19
ภาพ 8 แสดงโครงสร้างของสารมาติคาสโซไซไซด์จากใบบัวบก	27
ภาพ 9 แสดงทฤษฎีและขั้นตอนการศึกษาอันตรกิริยาของลิแกนด์และรีเซปเตอร์ด้วยเทคนิค โมเลกุลาร์ด็อกกิง.....	28
ภาพ 10 แสดงค่าความเป็นพิษของสารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเกล็ดเลือด โดยการวัดปริมาณ LDH, MA = madecassoside	37
ภาพ 11 แสดงผลของสารมาติคาสโซไซไซด์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 5 μ M ADP (ซ้าย) และ 2.5 μ g/ml collagen (ขวา) โดยมีกลุ่มควบคุมคือ 0.1% DMSO (เส้นสีเขียว) กลุ่มที่เติม สารมาติคาสโซไซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M (เส้นสีแดง) และกลุ่มที่เติมสารมาติคาสโซไซไซด์ ความเข้มข้น 200 μ M (เส้นสีม่วง), MA = madecassoside	39
ภาพ 12 แสดงการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและ สารมาติคาสโซไซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ เวลา 10, 20 และ 30 นาที กำลังขยาย 100 เท่า.....	41
ภาพ 13 แสดงจำนวนการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาติ คาสโซไซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ เวลา 30 นาที กำลังขยาย 100 เท่า.....	41

ภาพ 14 แสดงจำนวนการเกาะติดและการแผ่ขยายของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาตีคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ณ เวลา 30 นาที	42
ภาพ 15 แสดงลักษณะรูปร่างของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุม และสารมาตีคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ เวลา 30 นาที กำลังขยาย 200 เท่า....	43
ภาพ 16 แสดงร้อยละของลักษณะรูปร่างของเกล็ดเลือดแต่ละชนิดที่เกาะติดอยู่บนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาตีคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ณ เวลา 30 นาที	43
ภาพ 17 แสดงการแผ่ขยายของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิวที่เคลือบด้วย fibrinogen ในกลุ่มควบคุม และสารมาตีคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ ณ เวลา 30 นาที กำลังขยาย 360 เท่า.....	44
ภาพ 18 แสดงพื้นที่การแผ่ขยายของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิวที่เคลือบด้วย fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาตีคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ ณ เวลา 30 นาที.....	45
ภาพ 19 แสดงการเปรียบเทียบการหดตัวของก้อนไฟบรินในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO และกลุ่มที่ได้รับ สารมาตีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 μ M และ 400 μ M.....	46
ภาพ 20 แสดงโครงสร้างของโปรตีนตัวรับ P2Y ₁₂ บนเกล็ดเลือด	47
ภาพ 21 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y ₁₂ รหัส 4NTJ กับสารมาตีคาสโซไซด์ (ก) และ ticagrelor (ข).....	50
ภาพ 22 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y ₁₂ รหัส 4PXZ กับ 2MeSADP (ก) ticagrelor (ข) และสารมาตีคาสโซไซด์ (ค).....	51
ภาพ 23 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y ₁₂ รหัส 4PYO กับ 2MeSATP (ก) ticagrelor (ข) และสารมาตีคาสโซไซด์ (ค).....	51
ภาพ 24 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y ₁₂ รหัส 4NTJ กับ AZD1283 (ก) ticagrelor (ข) และสารมาตีคาสโซไซด์ (ค).....	52
ภาพ 25 แสดงอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน P2Y ₁₂ กับสารมาตีคาสโซไซด์ ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกิง.....	54
ภาพ 26 แสดงอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน P2Y ₁₂ กับ ticagrelor ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกิง.....	54

อักษรย่อ



HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
LDL	=	Low-Density Lipoprotein
CRP	=	C-reactive protein
PDGF	=	Platelet-Derived Growth Factor
LMWH	=	Low-Molecular-Weight Heparin
vWF	=	von Willebrand Factor
TGF	=	Transforming Growth Factor
PGI ₂	=	Prostacyclin
NO	=	Nitric oxide
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
cGMP	=	cyclic guanosine monophosphate
IP ₃	=	Inositol 1,4,5-trisphosphate
TP receptor	=	Thromboxane A ₂ Receptor or Thromboxane prostanoid receptor
TxA ₂	=	Thromboxane A ₂
COX	=	Cyclooxygenase
ADP	=	Adenosine Diphosphate
PAR	=	Protease-Activated Receptor
5HT _{2A} receptor	=	5-Hydroxytryptamine Receptor 2A
5-HI	=	5-Hydroxytryptamine
PI3K	=	Phosphoinositide 3-Kinase
Akt	=	Protein Kinase B
GSK3	=	Glycogen Synthase Kinase 3
MAPK	=	Mitogen-Activated Protein Kinase
AA	=	Arachidonic acid
DAG	=	Diacylglycerol
PIP ₂	=	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

อักษรย่อ (ต่อ)

PS	=	Phosphatidylserine
PE	=	Phosphatidylethanolamine
PF3	=	Platelet Factor 3
TRAP	=	Thrombin Receptor Activator Peptide 6
Fluo-3 AM	=	Fluo-3 Acetoxymethyl Ester
nm	=	nanometer
IC50	=	Inhibitory Concentration 50%
µg/ml	=	Micrograms per milliliter
PDB	=	Protein Data Bank
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
MD	=	Molecular Dynamics
RMSD	=	Root Mean Square Deviation
RMSF	=	Root Mean Square Fluctuation
Rg	=	Radius of Gyration
LDH	=	Lactate Dehydrogenase
g	=	Relative Centrifugal Force
PRP	=	Platelet-Rich Plasma
PPP	=	Platelet-Poor Plasma
µl	=	Microliter
DMSO	=	Dimethyl Sulfoxide
Cells/ml	=	Cells per milliliter
U/L	=	Units per liter
µM	=	Micromolar
Kcal/mol	=	Kilocalorie per mole
MA	=	Madecassoside
GPIa/IIa	=	Integrin $\alpha 2\beta 1$
GPIIb/IIIa	=	$\alpha 11\beta 3$
PIP3	=	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

อักษรย่อ (ต่อ)

P2Y ₁₂	=	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12
P2Y ₁	=	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1
PLC	=	Phospholipase C
AM	=	acetoxymethyl ester
PBS	=	Phosphate buffer saline
INR	=	International Normalized Ratio
tPA	=	tissue plasminogen activator
ATIII	=	antithrombin III
GP	=	glycoprotein
PKC	=	protein kinase C
RAM-1	=	Rat Anti-Mouse-1 antibody
Annexin V FITC	=	Annexin V conjugated with Fluorescein Isothiocyanate
PAC-1	=	Phycoerythrin-conjugated Antibody Clone-1
APC	=	Allophycocyanin
APC-Cy7	=	Allophycocyanin-Cyanine7
MAD	=	Madecassoside
ROS	=	Reactive Oxygen Species
2MeSADP	=	2-Methylthio-adenosine-5'-diphosphate
2MeSATP	=	2-Methylthio-adenosine-5'-triphosphate

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคหลอดเลือดสมองเป็นปัญหาสำคัญในระบบการสาธารณสุขไทยและทั่วโลก เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและความพิการทางร่างกาย ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์การเกิดโรคหลอดเลือดสมองในปี 2563 ร้อยละ 42.94 ต่อแสนประชากร (Lalun, & Vutiso, 2021) และเป็นโรคที่ก่อให้เกิดอาการทางระบบประสาท เมื่อเกิดโรคแล้วส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิต ผู้ป่วยต้องใช้เวลาในการฟื้นตัวค่อนข้างนาน เกิดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลหรือฟื้นฟูสภาพร่างกายของผู้ป่วยเพิ่มขึ้น พบว่าผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองที่รอดชีวิตจะมีความพิการหลงเหลืออยู่ ส่งผลกระทบต่อตัวผู้ป่วย ครอบครัว ชุมชน รวมถึงประเทศชาติอีกด้วย (Stinear, Lang, Zeiler, & Byblow, 2020) นอกจากนี้การเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันยังสามารถเกิดขึ้นกับผู้ป่วยมะเร็ง ผู้สูงอายุ ผู้มีภาวะอ้วน ผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ที่มีความดันโลหิตสูง รวมถึงหญิงตั้งครรภ์อีกด้วย (Previtali, Bucciarelli, Passamonti, & Martinelli, 2011)

ปัจจุบันการรักษาโรคหลอดเลือดสมองมีแนวทางการรักษา คือ ผ่าตัดสมอง การให้ยาต้านเกล็ดเลือดหรือยาลดการทำงานของเกล็ดเลือด เช่น ยาแอสไพริน (aspirin) ยาโคลพิโดเกรล (Clopedogrel) หรือยาทิกาเกรลอร์ (ticagrelor) โดยยาจะเน้นออกฤทธิ์ต่อกลไกสำคัญในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดไม่ให้เกิดลิ่มเลือด ป้องกัน รักษา ลดการกลับมาเป็นซ้ำ จากงานวิจัยหลายฉบับพบว่าการใช้ยา aspirin ก่อให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ ได้แก่ คลื่นไส้อาเจียน เลือดออกผิดปกติ โดยเฉพาะระบบทางเดินอาหาร (E. S. Huang, Strate, Ho, Lee, & Chan, 2011; Vane & Botting, 2003) ส่วนยา Clopedogrel มีผลข้างเคียงทำให้เกิดโรคไขกระดูกฝ่อ (McCarthy & Kockler, 2003) นักวิจัยจึงพยายามศึกษาและนำสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเกล็ดเลือดมาทดแทนการใช้ยาเพื่อรักษาโรคหลอดเลือดสมองนี้

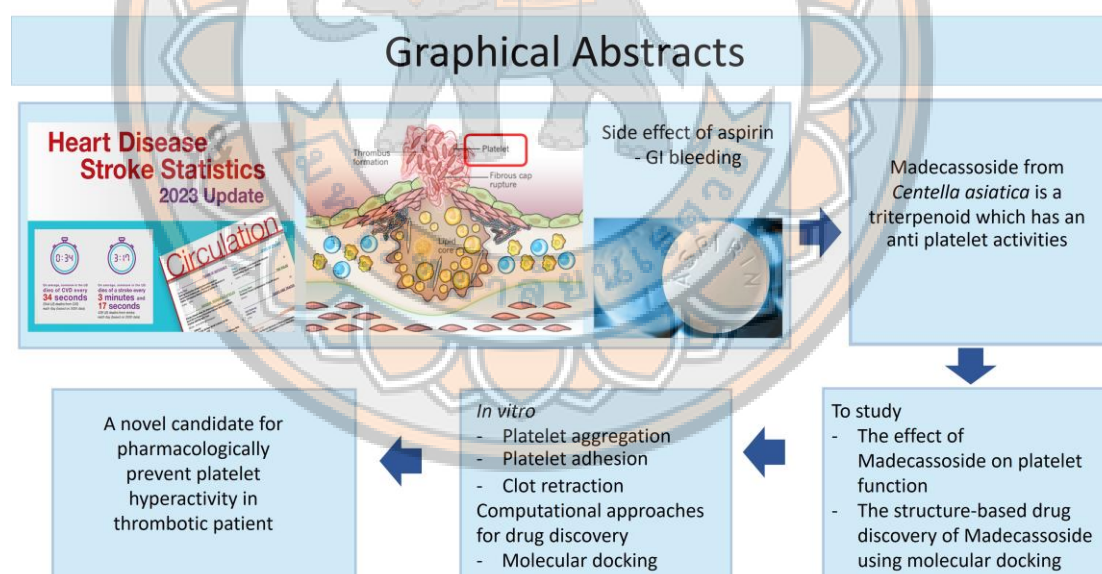
ในปี 2015 เสียร์วัฒน์ และคณะ ได้ศึกษาผลของสารมาติคาสโซไซด์ที่สกัดได้จากใบบัวบกต่อการเสริมฤทธิ์ยา aspirin เพื่อต้านการทำงานของเกล็ดเลือด พบว่าสารมาติคาสโซไซด์สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ใกล้เคียงกับการใช้ยา aspirin (Kraikate, Maksub, & Nilsri, 2015) ทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าว เป็นเพียงการศึกษาในเบื้องต้น และยังไม่ได้ทำการศึกษาผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดในเชิงลึกว่ามีกลไกเป็นอย่างไร การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการต้านการทำงานของเกล็ดเลือด โดยจะ

ทำการศึกษาผลของสารมาติคาสโซไซด์ในกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และการเกาะติดระหว่างเกล็ดเลือดกับ extracellular matrix รวมถึงศึกษาโมเลกุลเป้าหมายในการเข้าจับกันระหว่างสารและโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาทดแทนยาที่มีผลข้างเคียงกับร่างกายของผู้ป่วย อีกทั้งข้อมูลที่ได้ในครั้งนี้อาจจะทำให้มีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ยาชนิดใหม่สำหรับใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการเกาะติด การกระตุ้น และการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด
2. เพื่อทราบถึงโมเลกุลเป้าหมายในการเข้าจับกันระหว่างสารมาติคาสโซไซด์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด

ขอบเขตการวิจัย Conceptual framework



ภาพ 1 แสดงขอบเขตการวิจัย

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. สารมาติคาสโซไซด์ (MAD) หมายถึง สารสกัดจากใบบัวบกในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ที่สกัดได้จากใบบัวบก ซึ่งผ่านกรรมวิธีการผลิตด้วยหลักการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ที่ระดับความบริสุทธิ์ของสารมากกว่าหรือเทียบเท่ากับ 95%

2. การทำงานของเกล็ดเลือด หมายถึง กระบวนการเกาะติด การกระตุ้น และการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

3. โมเลกุลาร์ดีอกกิง (molecular docking) เป็นเทคนิคเชิงคำนวณ ที่ใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลขนาดเล็ก (ligand) กับโปรตีนเป้าหมาย (target protein) เพื่อทำนายลักษณะการจับ (binding pose) และค้นหาสารยับยั้งต้นแบบหรือสาร ligand ที่มีศักยภาพในการจับกับ target protein หรือตัวรับที่กำหนด

สมมุติฐานของการวิจัย

สารมาติคาสโซไซด์สามารถลดการทำงานของเกล็ดเลือดได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคหัวใจและหลอดเลือด

โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ โดยข้อมูลจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization-WHO) ระบุว่าโรคหัวใจและหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 1 ทั่วโลกมากกว่า 20 ล้านคน และ 80% พบการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร ซึ่งสามารถป้องกันได้ ในประเทศไทยมีอุบัติการณ์การเกิดโรคหลอดเลือดสมอง ในปี 2561-2563 ร้อยละ 45.62, 46.48 และ 42.94 ต่อแสนประชากร (Lalun, & Vutiso, 2021) พบข้อมูลการรายงานของกระทรวงสาธารณสุข ปี 2565 พบว่าคนไทยเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดมากถึง 7 หมื่นราย เฉลี่ยชั่วโมงละ 8 คน และคาดว่าจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (Lalun, & Vutiso, 2021)

โรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว (Atherosclerosis) หมายถึง ภาวะการอักเสบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือดแดงชั้นใน ซึ่งเกิดจากการมีไขมัน Low-Density Lipoprotein (LDL) สะสมตัวกันที่ผนังหลอดเลือดก่อนหน้าตัวขึ้นเรื่อยๆ มีการดำเนินของโรคเป็นไปอย่างช้า ๆ อย่างต่อเนื่อง ทำให้ผนังหลอดเลือดแดงชั้นในแคบลง ชัดขวางการไหลเวียนของเลือด โดยมีปัจจัยส่งเสริมการทำลายเซลล์บุผนังด้านในของผนังหลอดเลือด ได้แก่ การสูบบุหรี่ การมีระดับ LDL และคลอเลสเตอรอลในเลือดสูง โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวานจากร่างกายต่อต้านอินซูลิน จนกระทั่งส่งผลต่อผนังหลอดเลือดแดงเกิดแข็งตัวขึ้นอย่างรวดเร็ว ในเพศชายจะพบความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง เพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากกว่า 45 ปีขึ้นไป ในเพศหญิงจะพบความเสี่ยงต่อการเกิดมากขึ้นเมื่ออายุมากกว่า 55 ปีขึ้นไป ร่วมกับการมีระดับโปรตีน C-reactive protein (CRP) ที่ระดับสูงอาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเหล่านี้ได้เช่นกัน (Singh, Suresh, Voleti, & Agrawal, 2008) ด้วยแรงเฉือนอันเกิดจากการไหลของกระแสเลือดในผนังหลอดเลือด จนเกิดการฉีกขาดของบาดแผลบริเวณผิวด้านในของหลอดเลือด เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว (Ogita, & Liao, 2004) ส่งผลให้ Endothelial cell เสื่อมรูปร่างเกิดช่องว่างที่กว้างขึ้น เมื่อเกิดการฉีกขาดของบาดแผล LDL จะเข้าไปอยู่ที่ subendothelial layer เกิดปฏิกิริยาทางเคมีและเกิด oxidative LDL คอยหลั่งสารสื่ออักเสบ เพื่อชักนำ monocyte ให้เข้าไปที่ subendothelial layer และเปลี่ยนเป็น macrophage เพื่อจับกิน oxidative LDL ให้กลายเป็น Foam cell และพบคราบไขมันสีเหลืองเรียกว่า fatty streak ซึ่งถือว่าเป็นระยะแรกของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวในบริเวณดังกล่าว จากนั้นจะมีการหลั่งสาร Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ

เซลล์กล้ามเนื้อเรียบและสังเคราะห์คอลลาเจน (collagen) ในชั้น intima มากขึ้น เกิดเป็นโครงสร้างปกคลุมก้อนไขมัน (Jianglin Fan, & Watanabe, 2003) ส่งผลให้ผนังหลอดเลือดแดงหนาตัวเรียกว่า atheroma หรือ atherosclerotic plaque และเนื้อเยื่อขาดเลือดไปหล่อเลี้ยง ถ้า atheroma เกิดการฉีกขาดจะมีการกระตุ้นการสร้างลิ่มเลือด เกิดอุดตันของหลอดเลือดอย่างเฉียบพลันนำมาซึ่งโรคหลอดเลือดหัวใจและสมอง (Insull Jr, 2009) โดยมีปัจจัยส่งเสริมการเกิดโรค ได้แก่ อายุที่เพิ่มขึ้น เพศ ประวัติครอบครัว การดื่มสุรา การสูบบุหรี่ ระดับไขมันในเลือดสูง โรคอ้วน ระดับความดันโลหิตที่สูง ระดับน้ำตาลในเลือดสูงมักเกิดร่วมในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และโรคความดันโลหิตสูง ความเสี่ยงจะเพิ่มมากขึ้นอีก เมื่อผู้ป่วยมีความเครียดและไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหรือระดับความดันโลหิตได้ นอกจากนี้การเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันขึ้นมักพบการเกิดในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดแล้ว ยังสามารถเกิดกับผู้ป่วยมะเร็ง ผู้สูงอายุ ผู้มีภาวะอ้วน ผู้ป่วยเบาหวานและผู้ที่มีความดันโลหิตสูง รวมถึงหญิงตั้งครรภ์อีกด้วย (Previtali et al., 2011) ตามเป้าหมายการรักษา ในปัจจุบันการค้นหาโรคหลอดเลือดหัวใจและสมอง ได้อย่างรวดเร็วถือว่าเป็นสิ่งสำคัญที่สุดในการรักษา หากปล่อยไว้จะทำให้หัวใจและสมองเกิดความเสียหายมากขึ้น การได้รับการรักษาภายในระยะเวลา 3-4.5 ชั่วโมง จึงเป็นสิ่งจำเป็น และยาที่แพทย์มักใช้ในการรักษา (Marler et al., 2000) ได้แก่

1. ยาละลายลิ่มเลือด (Thrombolytic drugs) เป็นยาที่ใช้เพื่อละลายลิ่มเลือดที่อุดตันอยู่ในหลอดเลือด ซึ่งช่วยให้เลือดสามารถไหลเวียนกลับมาได้ตามปกติ และลดความเสียหายของเนื้อเยื่อที่ขาดเลือด ยากลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อให้ภายในระยะเวลาอันสั้นหลังเกิดการอุดตัน เช่น ภายใน 4.5 ชั่วโมงในกรณีโรคหลอดเลือดสมองตีบ หรือภายใน 12 ชั่วโมง ในกรณีกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ plasminogen ให้เป็น plasmin เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลาย Fibrin ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของลิ่มเลือด ส่งผลให้ลิ่มเลือดละลายและหลอดเลือดกลับมาเปิดได้อีกครั้ง ตัวอย่างยาที่ใช้บ่อย (Powers et al., 2019) ได้แก่

- 1.1 Alteplase (tPA: tissue plasminogen activator) เป็นยามาตรฐานที่ใช้รักษาโรคหลอดเลือดสมองตีบเฉียบพลัน โดยต้องให้ภายใน 4.5 ชั่วโมงหลังเริ่มมีอาการ

- 1.2 Reteplase และ Tenecteplase เป็นยารุ่นใหม่ที่มีโครงสร้างดัดแปลงจาก tPA ให้มีครึ่งชีวิตยาวขึ้นและสามารถให้ยาแบบฉีด bolus มักให้ทางหลอดเลือดดำใช้เมื่อจำเป็นต้องให้ยาออกฤทธิ์เร็ว เช่น ภาวะฉุกเฉิน ได้สะดวกกว่า

- 1.3 Streptokinase และ Urokinase เป็นยารุ่นเก่าที่ใช้ในการละลายลิ่มเลือดแต่ปัจจุบันใช้น้อยลงเนื่องจากมีความเสี่ยงต่ออาการแพ้และมีประสิทธิภาพต่ำกว่ายารุ่นใหม่

ผลข้างเคียงสำคัญของยาละลายลิ่มเลือด คือ การเกิดเลือดออกโดยเฉพาะในสมอง ดังนั้นก่อนให้ยาจะต้องมีการประเมินข้อห้ามอย่างรอบคอบ เช่น ผู้ป่วยที่มีประวัติเลือดออกในสมองหรือเพิ่งได้รับการผ่าตัดใหญ่ในระยะเวลาไม่นาน (Lopes et al., 2019)

2. ยาต้านเกล็ดเลือด (Antiplatelet drugs) เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการเกิดลิ่มเลือดภายในหลอดเลือด เมื่อมีการอุดตันเกิดขึ้นอาจนำไปสู่ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน หรือโรคหลอดเลือดสมองได้ ดังนั้นยาเหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญในการลดความเสี่ยงการเกิดลิ่มเลือดอุดตันและป้องกันการเกิดซ้ำของโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองในระยะยาว (Sibbing et al., 2023) ตัวอย่างยาที่ใช้ในการรักษา ได้แก่

2.1 aspirin เป็นยาต้านเกล็ดเลือดที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุด มีกลไกการออกฤทธิ์โดยยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase-1 (COX-1) ในเกล็ดเลือด ทำให้การสร้าง thromboxane A₂ (TXA₂) ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มและทำให้หลอดเลือดหดตัวลดลง ส่งผลให้การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดลดลง (Vane, & Botting, 2003) ผลข้างเคียงที่อาจพบ ได้แก่ การระคายเคืองกระเพาะอาหาร เลือดออกในทางเดินอาหาร ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน มึนงง หรือมีผื่นแพ้ยาในบางราย

2.2 clopidogrel เป็นยาในกลุ่ม Adenosine Diphosphate (ADP) receptor antagonist มีกลไกโดยการยับยั้งการจับของสาร ADP ที่ตัวรับ Purinergic receptor P2Y₁₂, G-protein coupled, 12 (P2Y₁₂) บนผิวเกล็ดเลือดแบบถาวรส่งผลให้สัญญาณกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดลดลง (Oury, Toth-Zsamboki, Vermeylen, & Hoylaerts, 2006) clopidogrel ต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงในตับก่อนออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ใช้ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบหรือหลังการใส่ขดลวดหัวใจ เพื่อป้องกันการเกิดลิ่มเลือดซ้ำ ผลข้างเคียงที่อาจพบ ได้แก่ ภาวะเลือดออกง่าย ผื่น หรือในกรณีที่พบไม่บ่อยคือ ภาวะไขกระดูกฝ่อ (McCarthy, & Kockler, 2003)

2.3 ticagrelor เป็นยาต้านเกล็ดเลือดชนิดใหม่ในกลุ่มเดียวกับ clopidogrel โดยออกฤทธิ์ยับยั้งตัวรับ ADP เช่นกัน แต่แตกต่างกันตรงที่ ticagrelor ไม่จำเป็นต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงในตับก่อนออกฤทธิ์ และมีลักษณะเป็น reversible inhibitor คือ สามารถจับกับตัวรับและหลุดออกได้เมื่อหมดฤทธิ์ยา (Storey et al., 2010) ยานี้จึงออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดสูงกว่า clopidogrel มักใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน หรือในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาเกิน 4.5 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิดลิ่มเลือดอุดตันซ้ำในระยะยาว (Alburyhi, Saif, & Noman, 2024) ผลข้างเคียงที่พบได้ เช่น หายใจลำบาก เลือดออกง่าย และอาจมีอัตราการเต้นของหัวใจช้าลงในบางราย

ยาต้านเกล็ดเลือดทั้งหมดมีเป้าหมายเพื่อลดการเกิดลิ่มเลือด โดยมีความแตกต่างในกลไกการออกฤทธิ์และลักษณะการยับยั้งตัวรับ การเลือกใช้ยาขึ้นอยู่กับระยะของโรคและความเหมาะสมของผู้ป่วย โดย aspirin มักใช้เป็นยาหลักในการป้องกันระยะยาว ส่วน clopidogrel และ ticagrelor นิยมใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดหรือมีความเสี่ยงสูงในการเกิดซ้ำของลิ่มเลือด

3. ยาต้านการแข็งตัวของเลือด (Anticoagulant drugs) เป็นยาที่ใช้เพื่อป้องกันการเกิดลิ่มเลือดภายในหลอดเลือดหรือหัวใจ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของภาวะอุดตันของหลอดเลือดสมอง หรือ กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ยากลุ่มนี้มักใช้ในผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะชนิด atrial fibrillation ผู้ป่วยหลังการผ่าตัดใหญ่ ผู้ที่มีลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดดำ (DVT) หรือ ภาวะลิ่มเลือดอุดตันในปอด (PE) เพื่อป้องกันการกลับมาเกิดซ้ำในระยะยาว ยาต้านการแข็งตัวของเลือดจะยับยั้งการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือด ในกระบวนการสร้างลิ่มเลือด โดยมีหลายกลุ่มที่ออกฤทธิ์แตกต่างกัน (Ferri, Colombo, Tenconi, Baldessin, & Corsini, 2022) ได้แก่

3.1 Heparin และ Low Molecular Weight Heparin (LMWH) เป็นยาฉีดที่ออกฤทธิ์เร็ว โดยจับกับ antithrombin III (ATIII) ซึ่งเป็นสารต้านการแข็งตัวตามธรรมชาติในร่างกาย ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของ ATIII ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทรอมบิน (thrombin=factor IIa) และ factor Xa ส่งผลให้การเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin ลดลงจึงไม่เกิดลิ่มเลือดใหม่ LMWH เช่น enoxaparin, dalteparin, tinzaparin มีโครงสร้างขนาดเล็กกว่า ออกฤทธิ์เฉพาะเจาะจงกับ factor Xa มากกว่า thrombin ทำให้มีผลข้างเคียงน้อยกว่า และสามารถให้ในขนาดคงที่โดยไม่ต้องตรวจค่าการแข็งตัวของเลือดบ่อยครั้ง

3.2 Vitamin K antagonists เช่น Warfarin ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่ต้องอาศัยวิตามินเค ได้แก่ factor II, VII, IX และ X โดยใช้เวลาหลายวันกว่าจะออกฤทธิ์เต็มที่ จึงนิยมใช้ในการรักษาระยะยาว

3.3 Direct oral anticoagulants (DOACs) ยารุ่นใหม่ เช่น dabigatran ยับยั้ง thrombin โดยตรง และ rivaroxaban, apixaban ยับยั้ง factor Xa โดยตรง มีข้อดีคือรับประทานได้ ไม่ต้องตรวจค่า International Normalized Ratio (INR) เป็นประจำ และมีความเสี่ยงต่อการเกิดเลือดออกน้อยกว่า warfarin

ข้อควรระวังและอาการข้างเคียง ผลข้างเคียงที่สำคัญของยากลุ่มนี้ คือ การเกิดเลือดออก เช่น มีจ้ำเลือดง่าย เลือดกำเดาไหล หรือเลือดออกในอวัยวะภายใน ผู้ป่วยที่ใช้ยา warfarin จำเป็นต้องตรวจค่า INR เพื่อควบคุมระดับยาให้อยู่ในช่วงที่ปลอดภัย (Hirsh et al., 2008)

เกล็ดเลือด

เกล็ดเลือด (Platelet หรือ Thrombocyte) คือ ชิ้นส่วนที่หลุดออกมาจากไซโตพลาสซึมของเซลล์เมกะคาริโอไซต์ที่สร้างจากไขกระดูก ไม่มีนิวเคลียส รูปร่างกลมรีคล้ายจาน (discoid shape) มีขนาดประมาณ 1.5-2 μm

1. โครงสร้างของเกล็ดเลือด เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนประกอบไปด้วย

1.1 Peripheral zone เป็นเยื่อหุ้มเกล็ดเลือด ทำหน้าที่เกาะติดกับหลอดเลือดตรงบริเวณที่มีการฉีกขาด และเป็นทางผ่านเข้าออกของสาร โปรตีนต่าง ๆ ระหว่าง เกล็ดเลือดและพลาสมา รวมถึงเป็นทางผ่านของสารที่ปล่อยออกมาจากเกล็ดเลือดขณะถูกกระตุ้น บนผิวของเกล็ดเลือดมี glycoprotein (GP) receptor เช่น GPIIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX/V, GPIIb, thrombospondin นอกจากนี้ยังมี phospholipids เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง TXA_2 ในเกล็ดเลือดเพื่อทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

1.2 Sol-gel zone (Structural zone หรือ thrombosthenin) เป็นส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ ประกอบด้วย platelet cytoskeleton ได้แก่ ไมโครทิวบูล มีหน้าที่ทำให้เกล็ดเลือดคงรูปร่างได้ในสภาวะปกติ ไมโครฟิลาเมนต์ มีหน้าที่ช่วยในการหดตัวของเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น แอคติน (actin) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในเกล็ดเลือด ภายหลังจากที่มีการกระตุ้นเกล็ดเลือดนั้นจะเกิด F actin อย่างรวดเร็วในระหว่างการกระตุ้นเกล็ดเลือด และไมโอซิน (myosin) จะเกิด filament

1.3 Organelle zone ประกอบด้วย platelet granule 2 ชนิด คือ

1.3.1 Dense granules ภายใต้มีสารที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ได้แก่ ATP, ADP, serotonin และ calcium

1.3.2 Alpha granules เป็นแกรนูลที่พบได้มากที่สุดในเกล็ดเลือด ประกอบด้วย

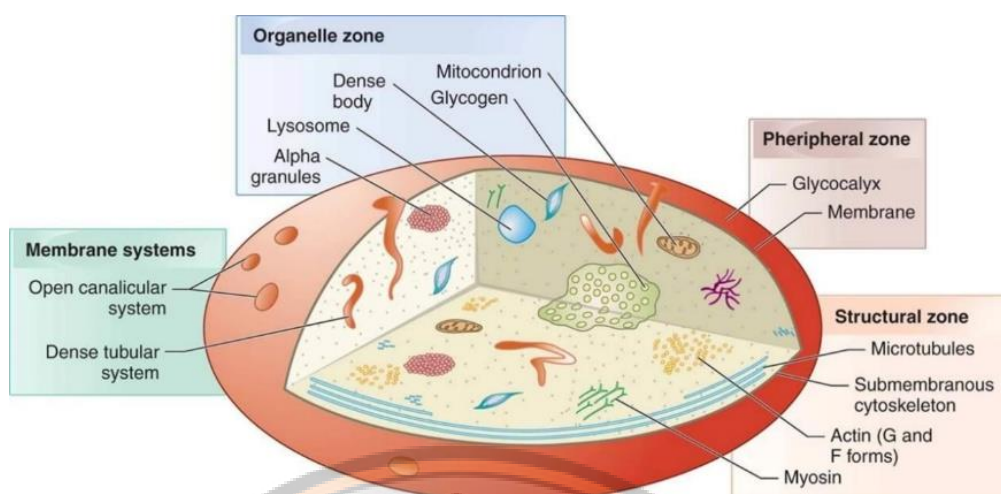
1) Adhesive protein ได้แก่ fibrinogen, fibronectin, GPIIb/IIIa, von Willebrand factor (vWF), P-selectin, thrombospondin และ vitronectin

2) Growth-promoting factors ได้แก่ PDGF, platelet factor 4 และ transforming growth factor (TGF)

3) Coagulation factors ได้แก่ factor V, XI, XIII

4) Antifibrinolytic factors ได้แก่ plasminogen activator inhibitor 1

1.4 Membrane zone ประกอบด้วย dense tubular system ทำหน้าที่เก็บและปล่อย calcium ออกมาใน cytoplasm และ Open canalicular system มีบทบาททำให้เกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น filopodia (Oluwagbemiga, 2015) แสดงดังภาพ 2



ภาพ 2 แสดงโครงสร้างเกล็ดเลือด ประกอบด้วย Peripheral Zone Structure zone Organelle zone และ Membrane zone

ที่มา: Oluwagbemiga, 2015

ในคนปกติจะมีปริมาณเกล็ดเลือดไหลเวียนอยู่ในเลือดประมาณ $140-400 \times 10^9$ ต่อลิตร มีอายุเพียง 7-10 วัน เมื่อหมดอายุไขจะถูกกำจัดโดยตับและม้าม (Moore, Mumaw, & Schoenberg, 1964) ปกติเกล็ดเลือดมักอยู่ในรูป resting discoid forms คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและไม่เกาะจับกับหลอดเลือด เนื่องจากบริเวณผิวของเยื่อหุ้มหลอดเลือดนั้นมีลักษณะเรียบลื่น เซลล์เยื่อหุ้มนี้ยังหลั่งสาร prostacyclin (PGI_2) และ nitric oxide (NO) ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet inhibitors) ซึ่ง PGI_2 จะออกฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ adenylate cyclase ส่วน NO จะออกฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ guanylate cyclase จึงส่งผลต่อระดับของ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) และ cyclic guanosine monophosphate (cGMP) ให้เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ และปริมาณ cyclic mononucleotides ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลทำให้การสร้าง inositol triphosphate (IP3) ลดลง สัมพันธ์กับการหลั่ง calcium ที่ลดลง จึงทำให้การกระตุ้นเกล็ดเลือดลดลง (Birukova et al., 2007)

เมื่อหลอดเลือดเกิดบาดแผลขึ้น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ชั้นเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือด จะถูกเปิดออกซึ่งประกอบไปด้วย adhesive proteins ที่สำคัญได้แก่ collagen, vWF, fibronectin และ thrombospondin เป็น ligands ที่สามารถจับกับตัวรับชนิดต่างๆ บนผิวของเกล็ดเลือดขณะล่องลอยอยู่ในกระแสเลือด นอกจากนี้สารในกลุ่ม soluble platelet agonists ก็ยังสามารถจับกับตัวรับบนผิวของเกล็ดเลือดได้ด้วยเช่นกัน

2. ตัวรับบนผิวของเกล็ดเลือด แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

2.1 ตัวรับ adhesion proteins

เป็นตัวรับที่ช่วยให้เกล็ดเลือดเกาะติดกับผนังหลอดเลือดที่บาดเจ็บส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีน (glycoprotein, GP) ได้แก่

2.1.1 GPIb/IX/V complex เป็นตัวรับที่จับกับ vWF ที่ยึดติดอยู่กับ collagen และ vWF เป็น GP ที่สร้างมาจากเซลล์เยื่อบุผิวของหลอดเลือด และเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่คำจุนเยื่อบุผิวของหลอดเลือด จะปรากฏอยู่บนผิวของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ vWF ยังถูกสร้างมาจาก megakaryocytes โดยเก็บไว้ใน alpha granules ของเกล็ดเลือด เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นจะเกิดการหลั่ง vWF ออกมาจาก granules ล่องลอยอยู่ในกระแสเลือด เมื่อผ่านไปพบบริเวณหลอดเลือดที่เกิดการบาดเจ็บจึงเข้าจับอยู่บน collagen และ Collagen receptors มี 2 ชนิด คือ GPVI เป็นตัวรับที่จับกับ collagen แต่เป็นการจับที่ไม่แน่น ส่วน Integrin $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa) เป็นตัวรับที่จับกับ collagen type I และ III ซึ่งสามารถเข้าจับกับเกล็ดเลือดได้สูงสุด เมื่อ GPIa/IIa จับกับ collagen จะช่วยส่งเสริมให้ GPVI จับกับ collagen ได้แน่นขึ้น และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ integrin $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa) ให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถจับกับ ligands ได้

2.1.2 GPIIb/IIIa เป็นตัวรับที่มีจำนวนมากที่สุดบนผิวของเกล็ดเลือด และเป็นตัวรับหลักในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด โครงสร้างของ GPIIb/IIIa จะอยู่ในรูป inactive แต่เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้อยู่ในรูป active สามารถจับกับ ligands เช่น fibrinogen หรือ vWF ซึ่งทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างโมเลกุลของเกล็ดเลือดเข้าด้วยกัน จึงทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (D'souza, Ginsberg, Burke, & Plow, 1990)

2.2 ตัวรับสำหรับ soluble platelet agonists

เป็นตัวรับที่ตอบสนองต่อสารกระตุ้นที่ละลายน้ำได้ (agonists) โดยมีตัวรับที่สำคัญ ได้แก่

2.2.1 P2Y purinoceptor เป็นตัวรับที่มี ADP เป็น agonist ได้แก่ Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 1(P2Y₁) และ P2Y₁₂ บนผิวของเกล็ดเลือดมักพบ P2Y₁₂ เป็นส่วนใหญ่จึงเป็นเป้าหมายหลักของยาในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด โดย ADP จะหลั่งมาจาก dense granules ของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น จัดเป็นสารช่วยกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่มีประสิทธิภาพสูง (Hardy, Jones, Mundell, & Poole, 2004)

2.2.2 Thromboxane prostanoid (TP) receptor เป็นตัวรับที่มี TXA₂ เป็น agonist โดย TXA₂ ถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ COX และ thromboxane synthase ตามลำดับ โดย TXA₂ นั้นออกฤทธิ์ 2 อย่าง คือ ทำให้หลอดเลือดหดตัว

และเป็นสารกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่มีประสิทธิภาพสูงเช่นเดียวกับ ADP (Cheng et al., 2002)

2.2.3 Proteinase-activated receptor (PAR) หรือ Thrombin receptor เป็นตัวรับที่มี thrombin เป็น agonist พบได้ 4 ชนิด คือ PAR-1, -2, -3 และ -4 แต่จะพบ PAR-1 เป็นหลัก ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น ligands จับและกระตุ้นตัวรับทำให้เกิด signaling ต่อไป (Kahn et al., 1998)

2.2.4 5-hydroxytryptamine 2A (5HT_{2A}) receptor เป็นตัวรับที่มี serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) เป็น agonist ออกฤทธิ์กระตุ้นเกล็ดเลือดให้มายังบริเวณบาดแผล และเกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้เช่นเดียวกับ ADP

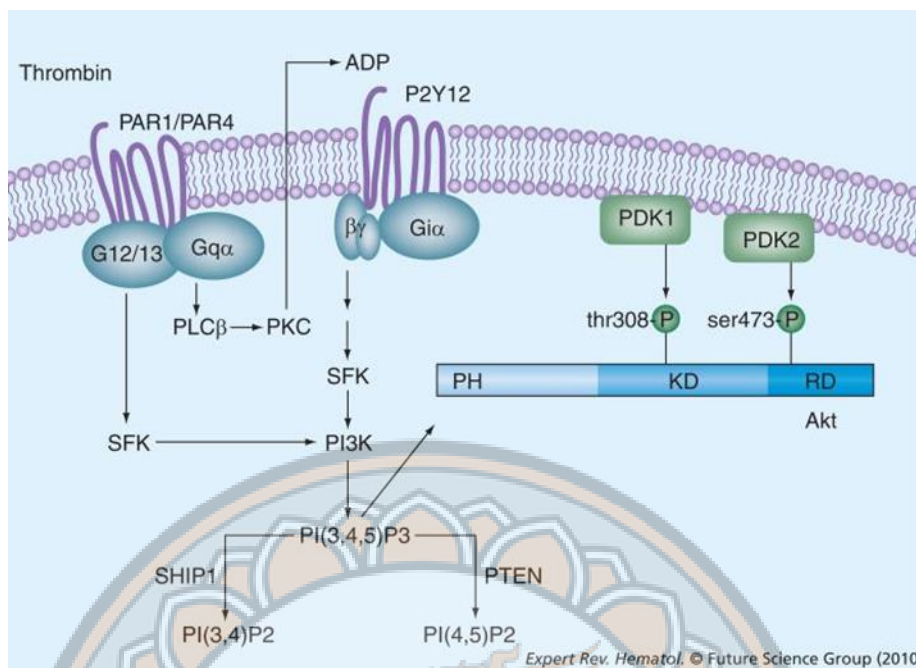
ตัวรับในกลุ่ม soluble platelet agonists มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิด positive feedback loops ของการกระตุ้นเกล็ดเลือดในรูปแบบต่อเนื่อง ทำให้เกล็ดเลือดมาเกาะกลุ่มกันเพิ่มมากขึ้น เมื่อตัวรับบนผิวของเกล็ดเลือดจับกับ ligands ชนิดต่าง ๆ แล้วจะเกิดการส่งทอดสัญญาณภายในเซลล์ต่อเนื่องกันหลายขั้นตอนในรูปแบบต่างๆ

3. การส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Signal transduction pathways)

เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น เช่น collagen, thrombin หรือสารอื่นจะมีการส่งสัญญาณภายในเซลล์เกิดขึ้น เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เกาะติด การเกาะกลุ่ม และปล่อยสารภายในเซลล์ สองเส้นทางที่สำคัญ คือ Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Protein Kinase B (Akt) pathway และ Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway ทั้งสองเส้นทางนี้ทำหน้าที่เป็นทางส่งสัญญาณที่อยู่ภายในเซลล์เกล็ดเลือด เมื่อตัวรับบนผิวเซลล์ถูกกระตุ้น

เส้นทาง PI3K/Akt เมื่อสารกระตุ้น (เช่น ADP หรือ thrombin) จับกับตัวรับบนผิวเกล็ดเลือด เช่น P2Y₁₂ receptor (สำหรับ ADP) PAR receptor (สำหรับ thrombin) จะกระตุ้นเอนไซม์ PI3K และ PI3K จะเปลี่ยน phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ให้กลายเป็น phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP₃) และ PIP₃ ทำให้ Akt ถูกดึงไปที่เยื่อหุ้มเซลล์และถูก phosphorylation เมื่อ Akt ถูก phosphorylation มันจะส่งสัญญาณต่อไปยังโปรตีนอื่น เช่น Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) ทำให้เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นได้มากขึ้น ผลลัพธ์ คือ เกล็ดเลือดมีการรวมตัว ปล่อยสาร และทำหน้าที่ได้มากขึ้น (Moroi & Watson, 2015) แสดงดังภาพ 3

เส้นทาง MAPK เมื่อถูกกระตุ้นโปรตีนกลุ่ม MAPK จะถูก phosphorylation ส่งสัญญาณไปยังโปรตีนอื่นที่ควบคุมการเกาะติด การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง หรือการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด อีกทั้งเส้นทาง MAPK และ PI3K/Akt มักมีการ cross-talk กัน คือ มีการเชื่อมโยง/มีผลกระทบซึ่งกันและกันทำให้การควบคุมการตอบสนองของเกล็ดเลือดมีความซับซ้อนมากขึ้น



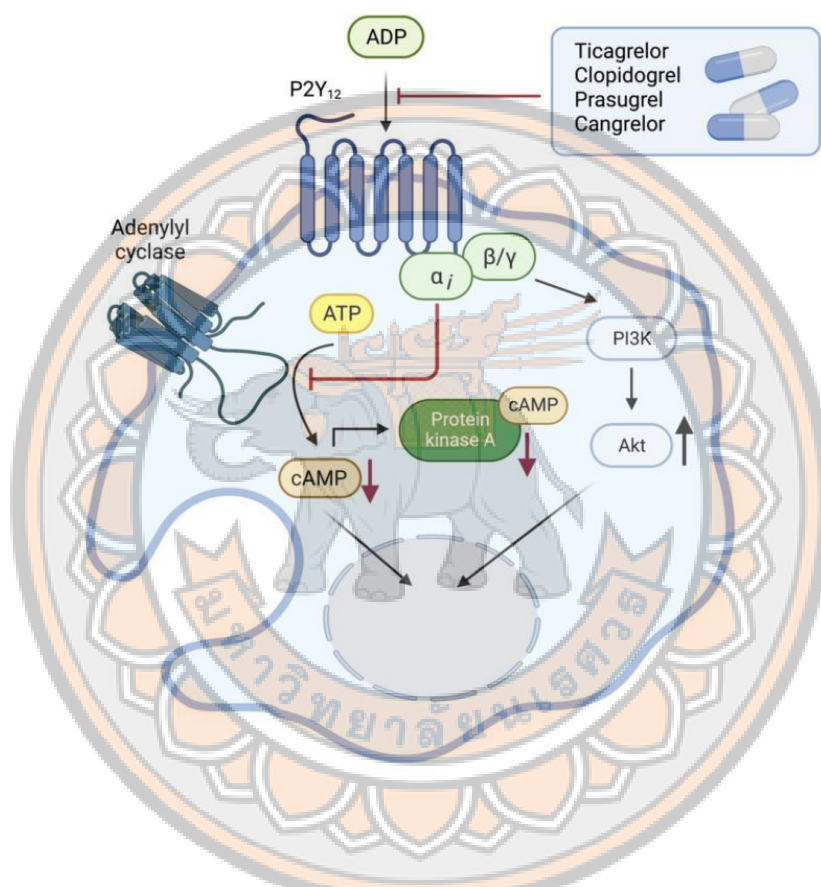
ภาพ 3 แสดงกลไกการกระตุ้นเส้นทาง PI3K/Akt โดย ADP และ Thrombin

ที่มา: Woulfe, 2010

Phosphorylation คือ การที่โปรตีนถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (-PO₄) เข้าไปซึ่งมักจะเป็นสัญญาณเปิดใช้งาน (หรือบางครั้งยับยั้ง) การทำงานของโปรตีนในเกล็ดเลือดเมื่อ Akt หรือ MAPK ถูก phosphorylation จะเปลี่ยนสถานะโปรตีนส่งผลให้เกล็ดเลือดพร้อมทำงานมากขึ้น (Chen et al., 2022) ดังนั้นการตรวจวัดการ Phosphorylation ของ Akt หรือ MAPK จึงเป็นดัชนีหนึ่งของการถูกกระตุ้นของเกล็ดเลือด

ADP-P2Y₁₂ Receptor Pathway หมายถึง เส้นทางส่งสัญญาณภายในเซลล์เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดย ADP ผ่านตัวรับ P2Y₁₂ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นและเกาะกลุ่มเพื่อห้ามเลือดเมื่อเกิดบาดแผลหรือหลอดเลือดเกิดการบาดเจ็บ เกล็ดเลือดจะสัมผัสกับ collagen ใต้ผนังหลอดเลือดและถูกกระตุ้นให้ปล่อยสารต่าง ๆ จากภายใน granule หนึ่งในสารที่ถูกปล่อยออกมา คือ ADP บนผิวของเกล็ดเลือดมีตัวรับหลายชนิดหนึ่งในนั้น คือ P2Y₁₂ ซึ่งเป็นตัวรับชนิด G-protein coupled receptor (GPCR) เมื่อ ADP มาจับกับตัวรับนี้จะเกิดการส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์ เมื่อ P2Y₁₂ ถูกกระตุ้นจะไปยับยั้งเอนไซม์ adenylate cyclase ทำให้ระดับสารสื่อภายในชื่อว่า cAMP ลดลง ระดับ cAMP ที่ลดลงจะทำให้เกล็ดเลือดถูกกระตุ้นง่ายขึ้นพร้อมกันนั้นยังเปิดใช้งานเอนไซม์ PI3K ซึ่งไปกระตุ้น Akt สัญญาณเหล่านี้ช่วยให้ GPIIb/IIIa บนผิวเกล็ดเลือดเปิดใช้

งานสามารถจับกับ fibrinogen และทำให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่ม เกล็ดเลือดจะเกาะติดกันแน่นขึ้นเกิดลิ่มเลือดชั่วคราวปิดบาดแผล ช่วยให้เลือดหยุดไหลได้เร็วขึ้น หากเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นมากเกินไปอาจเกิดลิ่มเลือดอุดตัน ปัจจุบันยากกลุ่ม P2Y₁₂ inhibitors เช่น clopidogrel ticagrelor จะไปยับยั้งตัวรับ P2Y₁₂ ทำให้เกล็ดเลือดไม่รวมตัวกันง่าย ลดความเสี่ยงโรคหัวใจขาดเลือดและโรคหลอดเลือดสมอง (Dorsam, & Kunapuli, 2004) แสดงดังภาพ 4



ภาพ 4 แสดงการส่งสัญญาณภายหลังการกระตุ้นตัวรับ P2Y₁₂ โดย ADP

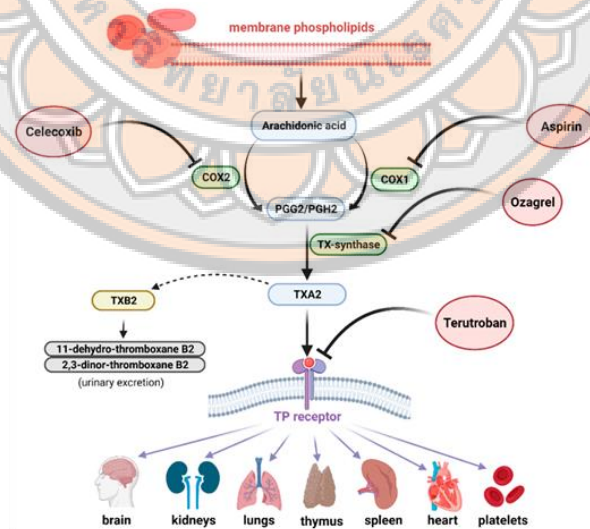
ที่มา: Entsie, Kang, Amofo, Schöneberg, & Liverani, 2023

COX-1 / TXA₂ Pathway หมายถึง เส้นทางการสร้างและการทำงานของสารกระตุ้นเกล็ดเลือดชื่อว่า TXA₂ ซึ่งเกิดขึ้นภายในเกล็ดเลือดโดยมีเอนไซม์สำคัญ คือ COX-1 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เส้นทางการนี้มีความสำคัญมากในการกระตุ้นเกล็ดเลือด และทำให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มเพื่อช่วยให้เลือดหยุดไหลเมื่อเกิดบาดแผล ขั้นตอนการทำงานของ COX-1/TXA₂ Pathway เริ่มต้นเมื่อหลอดเลือดเกิดการบาดเจ็บเกล็ดเลือดจะสัมผัสกับสาร collagen และถูกกระตุ้นให้ปล่อยเอนไซม์และ

สารต่าง ๆ ภายในเซลล์หนึ่งนั้น คือ การกระตุ้นเอนไซม์ Phospholipase A₂ (PLA₂) ทำหน้าที่ดึงกรดไขมัน AA ออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ AA ที่ได้จะถูกเปลี่ยนผ่านเอนไซม์ COX-1 ให้กลายเป็นสารชื่อ PGH₂ ซึ่งเป็นตัวกลางสำคัญในกระบวนการสร้างสาร Prostaglandin ต่าง ๆ เกิดเลือดจะใช้เอนไซม์ตัวถัดมา คือ Thromboxane Synthase เปลี่ยน PGH₂ → TXA₂ เมื่อสร้างเสร็จ TXA₂ จะถูกปล่อยออกจากเกล็ดเลือดไปจับกับตัวรับชื่อ TP receptor ซึ่งอยู่บนผิวเกล็ดเลือดเองและผนังหลอดเลือดใกล้เคียง การจับนี้ทำให้เกิด

1. การกระตุ้นเปลี่ยนรูปร่างของเกล็ดเลือด
2. เพิ่มการแสดงออกของตัวรับ GPIIb/IIIa ซึ่งจำเป็นต่อการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด ทำให้หลอดเลือดบริเวณนั้นหดตัวเพื่อลดการเสียเลือด
3. ขยายสัญญาณการเกาะตัวของเกล็ดเลือด (platelet amplification) ผลลัพธ์รวมคือ

เกิดลิ่มเลือดชั่วคราวเพื่อหยุดเลือด ปัจจุบันยา aspirin เป็นตัวยับยั้ง COX-1 โดยตรง จะจับกับเอนไซม์ COX-1 และยับยั้งแบบถาวร (irreversible inhibition) ทำให้เกล็ดเลือดไม่สามารถสร้าง TXA₂ ได้ตลอดช่วงอายุของเกล็ดเลือด (7 วัน) ลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ดังนั้น aspirin จึงถูกใช้ป้องกันโรคหัวใจขาดเลือดและโรคหลอดเลือดสมอง (Crescente, Menke, Chan, Armstrong, & Warner, 2019) แสดงดังภาพ 5



ภาพ 5 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยาต้าน Thromboxane

ที่มา: Szczuko, Koziol, Kotłęga, Brodowski, & Drozd, 2021

4. การทำงานของเกล็ดเลือด

เกล็ดเลือดมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการห้ามเลือดในชั้นปฐมภูมิ (Primary hemostasis) และทุติยภูมิ (Secondary hemostasis) ดังนี้

4.1 การทำงานของเกล็ดเลือดในกระบวนการห้ามเลือดชั้นปฐมภูมิ คือ กลไกของหลอดเลือดและเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นเป็นอันดับแรกเมื่อหลอดเลือดได้รับอันตราย โดยหลอดเลือดจะมีการหดตัว ทำให้เลือดมาบริเวณที่บาดเจ็บได้น้อยลงเป็นการลดการสูญเสียเลือด การหดตัวของหลอดเลือดนี้ถูกควบคุมโดยระบบประสาท (Reflex) และระบบฮอร์โมนรวมทั้งสารเคมีที่สร้างจากเกล็ดเลือดด้วย เช่น serotonin, TXA₂ นอกจากหลอดเลือดจะหดตัวแล้วเกล็ดเลือดที่อยู่ในกระแสเลือดจะรวมตัวกันเกิดเป็น platelet plug อุดที่รอยรั่ว ขบวนการ primary hemostasis นั้น จะเกิดขึ้นภายหลังจากที่หลอดเลือดได้รับอันตรายภายในระยะเวลาเป็นวินาที ขบวนการนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

Platelet Adhesion เกล็ดเลือดสามารถเคลื่อนที่ มาเกาะกับ ชั้น subendothelial ของหลอดเลือดบริเวณที่ได้รับความเสียหายได้โดยอาศัยการจับกับ collagen และ vWF เนื่องจากบนผิวเกล็ดเลือดมีตัวรับสำหรับ collagen และ vWF คือ GPIa/IIa และ GPIb/IX/V complex ตามลำดับ

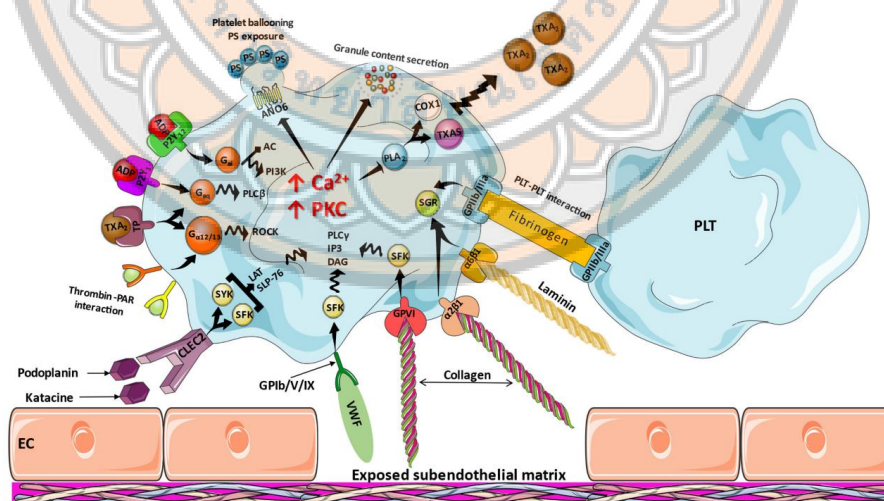
Platelet Activation ประกอบไปด้วย

Shape Change คือ การเปลี่ยนรูปร่างของเกล็ดเลือดจากปกติที่มีรูปร่างกลมไปเป็นเซลล์ที่มี projection ยื่นออกไปที่เรียกว่า filopodia โดยเมื่อ collagen จับกับตัวรับบนผิวเกล็ดเลือดจะทำให้เอนไซม์ phospholipase C (PLC) และ PLA₂ ถูกกระตุ้นจากนั้น PLC จะ hydrolyze PIP₂ ได้เป็น Diacylglycerol (DAG) และ IP₃ โดย DAG ถูกเอนไซม์ lipase เปลี่ยนเป็น AA ส่วนเอนไซม์ PLA₂ จะ hydrolyze phosphatidylcholine ได้เป็น AA เช่นกัน จากนั้น AA จะถูกเอนไซม์ COX เปลี่ยนเป็น TXA₂ ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นเกล็ดเลือดและมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัว ส่วน DAG และ IP₃ มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดกล่าวคือ IP₃ ทำให้แคลเซียมเคลื่อนย้ายเข้ามาสู่ platelet cytosol และกระตุ้น phosphorylation ของ myosin light chain ทำให้ myosin เกิด interact กับ actin มีผลทำให้ granule movement และการเปลี่ยนรูปร่างของเกล็ดเลือดไปเป็นเซลล์ที่มี projection ยื่นออกไปที่เรียกว่า filopodia และ DAG ยังมีฤทธิ์กระตุ้น protein kinase C (PKC) ซึ่งจะ phosphorylate protein “pleckstrin” ซึ่งควบคุม platelet granule secretion อีกต่อหนึ่ง (Aslan, 2017)

Release of Granule Contents เกล็ดเลือดจะมีการสังเคราะห์และเก็บสารที่ใช้ในกระบวนการห้ามเลือดไว้ในแกรนูล โดยแกรนูลของเกล็ดเลือดประกอบด้วย alpha granule และ dense granule หลังจากที่เกล็ดเลือดได้รับการกระตุ้นและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ต่อมาจะเกิดการ

เปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีภายในเกล็ดเลือด และเกิดการหลั่งสารต่างๆ ออกจากแกรนูล โดย vWF, fibrinogen และ coagulation factor จะหลั่งออกมาจาก alpha granule ส่วน Ca^{2+} , serotonin และ ADP จะหลั่งออกมาจาก dense granule และยังมี การเพิ่มปริมาณของ negative-charged phospholipid (Phosphatidylserine=PS) บน platelet membrane ซึ่งใช้ในกระบวนการสร้างลิ่มเลือดและทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ยังเกิดการสังเคราะห์ TXA_2 จาก phospholipid membrane ของเกล็ดเลือด ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นเกล็ดเลือดและทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดเช่นเดียวกับ ADP ที่หลั่งออกมาจาก dense-granule รวมทั้งมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัวเพื่อช่วยลดการสูญเสียเลือดจากบริเวณที่มีการฉีกขาดของหลอดเลือด

Platelet Aggregation เป็นการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นหลังจากที่มีการปลดปล่อยสารเคมีออกจากแกรนูลของเกล็ดเลือดแล้ว สารที่สำคัญ คือ ADP และ TXA_2 จะไปกระตุ้นเกล็ดเลือดตัวอื่นที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหลั่งสารต่างๆ ออกมาอีกเกิดเป็น autocatalytic reaction นอกจากนี้ fibrinogen ยังสามารถจับกับ GPIIb/IIIa ซึ่งเป็น platelet receptor ได้โดยที่ fibrinogen 1 โมเลกุลสามารถจับกับ GPIIb/IIIa ได้ 2 โมเลกุล ดังนั้น fibrinogen จึงทำหน้าที่เชื่อมระหว่างเกล็ดเลือด 2 ตัว (Platelet-platelet bridge) เมื่อเกล็ดเลือดมาเกาะกลุ่มรวมกันมากขึ้นจะเกิดเป็น platelet plug อุดบริเวณหลอดเลือดที่มีการฉีกขาดนั้น (Theofilis et al., 2022) แสดงดังภาพ 6



ภาพ 6 แสดงการทำงานของเกล็ดเลือด ประกอบด้วยกระบวนการเกาะติดผนังหลอดเลือด การเปลี่ยนรูปร่าง การหลั่งสาร และการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด

ที่มา: Theofilis et al., 2022

โดยสรุป คือ มีสารหลายชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดเลือดมาเกาะกลุ่มรวมกัน เช่น ADP, collagen, thrombin ทั้งนี้ collagen สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดได้โดยการกระตุ้นให้เกิดเลือดหลัง ADP และกระตุ้นการสร้าง TXA₂ ส่วน thrombin จะกระตุ้นให้เกิดเลือดเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและปลดปล่อยสารต่าง ๆ ออกมา TXA₂ จะกระตุ้นให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดและพบปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดเลือดทำหน้าที่ต่าง ๆ ได้นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของแคลเซียมภายในเซลล์ของเกล็ดเลือดและสารที่ควบคุมปริมาณของแคลเซียมก็ คือ cAMP ซึ่งเมื่อรวมกับ cAMP dependent protein แล้วจะทำให้ protein นั้นกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ของ protein ที่ทำหน้าที่เป็น receptor ซึ่งจับ Ca²⁺ ไว้ทำให้ความเข้มข้นของ Ca²⁺ ภายในเซลล์ลดลงส่งผลให้เกล็ดเลือดมีความสามารถในการเกิดการเกาะติดและเกาะกลุ่มลดลง

4.2 การทำงานของเกล็ดเลือดในกระบวนการห้ามเลือดขั้นทุติยภูมิ

Procoagulant activity เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นบน platelet membrane ก่อนการเกิดกระบวนการแข็งตัวของเลือดโดย activated platelet จะมีการสลับ membrane phospholipid คือ PS และ phosphatidylethanolamine (PE) ออกมาอยู่ด้านนอกทำให้มีความเป็นประจุลบมากขึ้นและจะเรียกบริเวณนี้ว่า Platelet factor 3 (PF3) และเมื่อบริเวณ membrane phospholipid มีความเป็นประจุลบมากขึ้นทำให้ Ca²⁺ สามารถเข้ามาจับบริเวณ PF3 นี้ได้และเมื่อมีการแสดงออกของ PF3 จะทำให้ coagulation factor ได้แก่ FII, FVII, FIX และ FX สามารถเข้ามาจับบริเวณ PF3 และเกิดกระบวนการแข็งตัวของเลือดเกิดเป็น Fibrin clot (Bever, Comfurius, & Zwaal, 1991)

5. การตรวจวิเคราะห์การทำงานของเกล็ดเลือด

5.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในเกล็ดเลือด

สามารถทำได้โดยใช้เทคนิคการย้อมสารเรืองแสง (fluorescent staining) ซึ่งช่วยให้เห็นการกระจายตัวของโปรตีนโครงสร้างเซลล์ที่สำคัญ ได้แก่ actin, myosin และ tubulin ซึ่งมีบทบาทแตกต่างกันในแต่ละระยะของการเกาะติดและการกระตุ้นของเกล็ดเลือด (Cuenca-Zamora, Ferrer-Marín, Rivera, & Teruel-Montoya, 2019)

Phalloidin เป็นสารเรืองแสงที่จับจำเพาะกับ F-actin ซึ่งเป็นเส้นใย actin ที่เกิดจากการพอลิเมอไรเซชันของ G-actin ภายในเซลล์การย้อมด้วย phalloidin จึงสามารถแสดงให้เห็นการจัดเรียงของเส้นใย actin ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น โดยในระยะแรกจะเห็นสัญญาณเรืองแสงที่ขอบเซลล์ และเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเกล็ดเลือดแผ่กระจายเต็มที่สะท้อนถึงการเกิด shape change และการ reorganize ของ cytoskeleton

Anti-myosin antibody ใช้ตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน myosin IIa ซึ่งทำงานร่วมกับ actin ในการเกิดการหดตัวของ cytoskeleton หลังจากเกล็ดเลือดเกิดการเกาะติด และกระจายตัวสมบูรณ์การย้อมด้วย anti-myosin จึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงกระบวนการหดตัวของเกล็ดเลือด และการเตรียมพร้อมสำหรับการหลั่งสารจาก granule

Anti-tubulin antibody ใช้ตรวจหาโปรตีน tubulin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ microtubules มีหน้าที่รักษารูปร่างของเกล็ดเลือดและช่วยในการขนส่ง granule ภายในเซลล์ในระยะเริ่มต้นของการกระตุ้น tubulin มักจัดเรียงเป็นวงรอบศูนย์กลางของเซลล์ แต่เมื่อเวลาผ่านไปจะกระจายออกสู่รอบนอกของ cytoplasm เพื่อรองรับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือด

ดังนั้น การย้อมสารเรืองแสงด้วย phalloidin, anti-myosin และ anti-tubulin จึงเป็นเทคนิคที่ช่วยให้สามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในเกล็ดเลือดได้อย่างละเอียด โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของ actin cytoskeleton ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญที่สะท้อนถึงระดับการกระตุ้นของเกล็ดเลือดในช่วงเวลาต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน (Montague, Lim, Lee, & Gardiner, 2020)

สัณฐานวิทยาของเกล็ดเลือด (Platelet Morphology) เกล็ดเลือด เป็นเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอย่างชัดเจนเมื่อได้รับการกระตุ้น ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของเกล็ดเลือดสามารถใช้บ่งชี้ระดับของการกระตุ้นได้ โดยแบ่งลำดับการเปลี่ยนแปลงได้เป็น 5 ระยะหลัก (Park, Mao, & Park, 1990) ได้แก่

1. ระยะ Round morphology (R) เกล็ดเลือดยังไม่ถูกกระตุ้นมีรูปร่างกลม เรียบ และไม่มีแขนยื่นออกจากผิวเซลล์ซึ่งเป็นสภาพที่ยังไม่เกิดการยึดเกาะกับพื้นผิวหรือโปรตีนที่กระตุ้น
2. ระยะ Dendritic platelet (D) เมื่อเกล็ดเลือดได้รับสิ่งกระตุ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยเริ่มยื่นแขนงขนาดเล็กที่เรียกว่า filopodia หรือ dendrites เพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสและเริ่มกระบวนการยึดเกาะ
3. ระยะ Spread dendritic morphology เกล็ดเลือดเริ่มแผ่ราบบางส่วนบนพื้นผิวแต่ยังคงเห็นแขนงที่ยื่นออกมาอย่างชัดเจน เป็นระยะกลางของการกระตุ้นซึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้าง actin cytoskeleton เปลี่ยนจาก filopodia ไปสู่ lamellipodia
4. ระยะ Spreading morphology (SD) เกล็ดเลือดมีการแผ่ราบมากขึ้น แขนงส่วนใหญ่หดตัวและเชื่อมต่อกันมีรูปร่างแผ่กว้างและแบนโดยเกิด lamellipodia เด่นชัดเป็นช่วงที่เกล็ดเลือดอยู่ในระดับการกระตุ้นสูง มีการแสดงตัวรับที่เกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่มและการหลั่งสารจาก granule

5. ระยะ Fully spread morphology (FS) เกิดเลือดจะมีการแผ่ราบเต็มที่ทั่วพื้นผิวไม่มีแขนงเหลืออยู่เซลล์มีการยึดติดแน่นกับพื้นผิวและจัดเรียงโครงสร้าง actin cytoskeleton อย่างสมบูรณ์ เป็นระยะที่เกิดเลือดถูกกระตุ้นเต็มที่ (fully activated platelet) พร้อมทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างลิ่มเลือด แสดงดังภาพ 7



ภาพ 7 แสดงสัณฐานวิทยาของเกล็ดเลือดบ่งชี้ระดับของการกระตุ้นโดยแบ่งลำดับการเปลี่ยนแปลงเป็น 5 ระยะหลัก

ที่มา: Raval et al., 2021

6. ศึกษาการวิเคราะห์หาพื้นที่การแผ่กระจายของเกล็ดเลือด (Platelet Spreading Area) ด้วยโปรแกรม ImageJ

การแผ่กระจายของเกล็ดเลือด (platelet spreading) เป็นหนึ่งในขั้นตอนสำคัญของกระบวนการกระตุ้นเกล็ดเลือด ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากเกล็ดเลือดสัมผัสกับพื้นผิวที่กระตุ้น เช่น collagen หรือ fibrinogen ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากลักษณะกลมเป็นรูปแผ่แบน (discoid shape) พร้อมกับการยึดขยายของ filopodia การประเมินลักษณะการแผ่กระจายของเกล็ดเลือดสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับการกระตุ้นของเกล็ดเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพในปัจจุบัน การวิเคราะห์พื้นที่การแผ่กระจายของเกล็ดเลือดนิยมใช้โปรแกรม ImageJ ซึ่งเป็นซอฟต์แวร์วิเคราะห์ภาพแบบโอเพนซอร์สที่ได้รับการพัฒนาโดยสถาบันสุขภาพแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (National Institutes of Health; NIH) โปรแกรมนี้สามารถใช้ในการวัดขนาดพื้นที่ เส้นรอบวง และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเซลล์ได้อย่างแม่นยำ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012) การใช้โปรแกรม ImageJ ในการวิเคราะห์พื้นที่การแผ่กระจายของเกล็ดเลือดมีข้อดี คือเป็นวิธีที่ไม่ซับซ้อน ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้ผลลัพธ์ที่สามารถทำซ้ำได้ อีกทั้งยังช่วยลดความคลาดเคลื่อนจากการประเมินด้วยสายตาได้อย่างมาก (Cosemans, Angelillo-Scherrer, Mattheij, & Heemskerk, 2013)

7. ศึกษาการตรวจวัดการกระตุ้นของเกล็ดเลือดด้วยเครื่อง Flow Cytometer

เป็นการตรวจการทำงานในเชิงปริมาณเพื่อดูการแสดงออกของ GP บนผิวของเกล็ดเลือด ซึ่งต้องอาศัยสารเรืองแสง ถูกลำมาใช้เพื่อวิเคราะห์การกระตุ้น การเปลี่ยนรูปร่าง และการเกิดภาวะ procoagulant ของเกล็ดเลือด โดยใช้สารเรืองแสงที่จำเพาะต่อโปรตีนหรือโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือด แต่ละชนิด ตัวบ่งชี้เรืองแสง (Fluorescent Markers) ที่ใช้ในการศึกษาการทำงานของเกล็ดเลือดมี ดังนี้

Rat Anti-Mouse-1 antibody (RAM-1) เป็นแอนติบอดีจำเพาะต่อเกล็ดเลือด ใช้เพื่อระบุและยืนยันว่าเซลล์ที่ตรวจวัดเป็นเกล็ดเลือดจริง ไม่ใช่เซลล์เม็ดเลือดชนิดอื่น (Kaiser et al., 2024)

Annexin V conjugated with Fluorescein Isothiocyanate (Annexin V FITC) เป็นสารเรืองแสงที่จับ PS ซึ่งเป็นฟอสโฟลิพิดที่ปกติอยู่ด้านในของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเกล็ดเลือด เข้าสู่ภาวะ procoagulant หรือเริ่มกระบวนการ apoptosis จะมีการกลับด้านของ PS มาสู่ผิววนอก ทำให้ Annexin V สามารถจับและให้สัญญาณเรืองแสงได้ (Heemskerck, Bevers, & Lindhout, 2002) การที่เกล็ดเลือดให้ผลบวกกับ Annexin V บ่งชี้ถึงการเกิดภาวะ procoagulant หรือการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ในระยะท้ายของการกระตุ้น

Phycoerythrin-conjugated Antibody Clone-1 (PAC-1) Allophycocyanin-Area (APC-A) เป็นแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวรับ GPIIb/IIIa บนผิวเกล็ดเลือด เกิดขึ้นเมื่อเกล็ดเลือด ถูกกระตุ้น (Shattil, Hoxie, Cunningham, & Brass, 1985) ดังนั้น การที่เกล็ดเลือดให้สัญญาณบวก กับ PAC-1 แสดงถึงการเปิดใช้งานของตัวรับ GPIIb/IIIa ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการเกาะกลุ่ม ของเกล็ดเลือด

P-selectin Allophycocyanin-Cyanine7 (APC-Cy7-A) เป็นตัวบ่งชี้ของการ ปลดปล่อยสารจาก granule ภายในเกล็ดเลือด โดยเฉพาะ alpha granule เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น P-selectin จะถูกปล่อยสู่ภายนอกของเซลล์ จึงสามารถตรวจจับได้ด้วยแอนติบอดีเรืองแสง การเพิ่มขึ้นของ P-selectin บ่งบอกถึงการกระตุ้นและการหลั่งสารออกจาก granule ซึ่งเป็นหนึ่งใน กลไกสำคัญในการทำงานของเกล็ดเลือด

การแปลผล การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer จะรายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ ของเกล็ดเลือดที่ให้สัญญาณเรืองแสงบวก (positive) ต่อ marker แต่ละชนิด (Shapiro, 2005) เช่น Annexin V แสดงถึงเกล็ดเลือดที่มีการแสดงของ PS → อยู่ในภาวะ procoagulant PAC-1 แสดง ถึงการเปิดใช้งานของตัวรับ GPIIb/IIIa → เกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่ม P-selectin แสดงถึงการหลั่ง สารจาก alpha granule → สะท้อนการกระตุ้นของเกล็ดเลือด

การแปลผลร่วมกันของ marker เหล่านี้ช่วยให้สามารถประเมินสภาวะการทำงานและระดับการกระตุ้นของเกล็ดเลือดได้อย่างละเอียดและมีความจำเพาะสูง

การกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วยสาร TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide) เป็นสารสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์เลียนแบบการกระตุ้นของเอนไซม์ thrombin ต่อเกล็ดเลือด โดย TRAP จะจับกับตัวรับชนิด protease-activated receptor-1 (PAR-1) ซึ่งเป็นหนึ่งในตัวรับสำคัญของ thrombin บนผิวเกล็ดเลือด (Vu, Hung, Wheaton, & Coughlin, 1991) การกระตุ้นตัวรับดังกล่าวทำให้เกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การปลดปล่อยสารจาก granule ภายในเซลล์ และการเปิดใช้งานของตัวรับ GPIIb/IIIa ซึ่งจำเป็นต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด โดยทั่วไป thrombin เป็นสารกระตุ้นเกล็ดเลือดที่มีประสิทธิภาพสูงมาก แต่เนื่องจาก thrombin มีฤทธิ์ต่อระบบการแข็งตัวของเลือดด้วย ทำให้ไม่สะดวกต่อการใช้งานในห้องปฏิบัติการที่ต้องการศึกษาเฉพาะกระบวนการของเกล็ดเลือดเท่านั้น ดังนั้นจึงนิยมใช้ TRAP ซึ่งเป็นเปปไทด์สังเคราะห์ที่สามารถกระตุ้นตัวรับ PAR-1 ได้อย่างจำเพาะ โดยไม่กระตุ้นระบบการแข็งตัวของพลาสมา การกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย TRAP จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะหลายประการ ได้แก่ การเปลี่ยนรูปร่างของเกล็ดเลือด เกล็ดเลือดจะเปลี่ยนจากรูปร่างกลม เป็นแบบมี filopodia เพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัส และการแสดงออกของ P-selectin บนผิวเซลล์ (α -granule secretion) บ่งบอกถึงการหลั่งสารจาก granule ภายในเซลล์ ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วยแอนติบอดีเรืองแสง เช่น P-selectin APC-Cy7

การเปิดใช้งานของตัวรับ GPIIb/IIIa ซึ่งเป็นตัวรับสำคัญในการยึดเกาะกับ fibrinogen และการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด สามารถตรวจวัดด้วย marker PAC-1 การเพิ่มระดับของแคลเซียมภายในเซลล์ ซึ่งเป็นตัวส่งสัญญาณหลักที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในเซลล์เกล็ดเลือด ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว TRAP จึงเป็นสารกระตุ้นที่นิยมใช้ในการศึกษากระบวนการกระตุ้นของเกล็ดเลือด โดยเฉพาะในงานวิจัยที่ต้องการประเมินระดับการกระตุ้นของตัวรับ GPIIb/IIIa หรือการหลั่งสารจาก granule ผ่านการตรวจด้วย Flow cytometer ซึ่งสามารถวัดสัดส่วนของเกล็ดเลือดที่ให้สัญญาณเรืองแสงบวก (positive) ต่อ marker ต่าง ๆ เช่น PAC-1, P-selectin ได้อย่างจำเพาะและแม่นยำ นอกจากนี้ TRAP ยังมีข้อดี คือ สามารถควบคุมความเข้มข้นในการกระตุ้นได้ง่าย ไม่ขึ้นกับเอนไซม์ และให้การตอบสนองต่อเกล็ดเลือดที่มีลักษณะคงที่จึงเหมาะสมสำหรับใช้งานวิจัยที่ต้องการเปรียบเทียบผลการกระตุ้นระหว่างกลุ่มตัวอย่าง เช่น การศึกษาผลของสารจากธรรมชาติ หรือสารสังเคราะห์ที่อาจมีฤทธิ์ต้านการกระตุ้นของเกล็ดเลือด (Shattil, & Newman, 2004)

8. การตรวจวัดระดับแคลเซียมภายในเกล็ดเลือดด้วยเทคนิค Flow cytometry

แคลเซียมภายในเซลล์ มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำงานของเกล็ดเลือด เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การเกาะติด และการเกาะกลุ่ม โดยเมื่อเกล็ดเลือดได้รับการกระตุ้นจาก สารกระตุ้นต่าง ๆ เช่น ADP collagen หรือ thrombin จะเกิดการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของระดับ Ca^{2+} ภายในไซโทพลาสซึม ซึ่งทำหน้าที่เป็น สารส่งสัญญาณระดับที่สอง (second messenger) เพื่อกระตุ้นกระบวนการภายในเซลล์ต่อเนื่อง (Assinger, Volf, & Schmid, 2015) การประเมินการเปลี่ยนแปลงของระดับ Ca^{2+} ภายในเกล็ดเลือดสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค Flow cytometry ร่วมกับ สารเรืองแสงที่ไวต่อแคลเซียม (Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye) เช่น Fluo-3 Acetoxymethyl Ester (Fluo-3 AM) หรือ Fluo-4 Acetoxymethyl Ester (Fluo-4 AM) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและให้ผลเชิงปริมาณที่เชื่อถือได้ (Jávega, Herrera, Martínez-Romero, & O'Connor, 2023) สารเรืองแสงชนิด acetoxymethyl ester (AM) มีคุณสมบัติซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และเมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์แล้ว เอนไซม์ภายในเซลล์จะตัดหมู่ AM ออก ทำให้สารเรืองแสงคงอยู่ภายในเซลล์ในรูปที่สามารถจับกับ Ca^{2+} ได้ เมื่อระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น สาร Fluo-4 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุล ส่งผลให้ความเข้มของแสงเรืองสีเขียวเพิ่มขึ้น (กระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่นประมาณ 488 nm และตรวจจับที่ 520 nm) (Tsien, 1989) กระบวนการตรวจวัดโดยทั่วไปเริ่มจากการแยกเกล็ดเลือดออกจากเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัว (เช่น sodium citrate) จากนั้นทำการย้อมด้วย Fluo-4 AM ภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและเวลา เพื่อให้สารซึมเข้าสู่เซลล์โดยไม่ทำให้เกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือด จากนั้นล้างเพื่อลดสารตกค้างที่อยู่นอกเซลล์ และอาจเติมสาร probenecid เพื่อยับยั้งการขับออกของสารเรืองแสง เมื่อเติมสารกระตุ้น เกล็ดเลือดจะตอบสนองโดยเพิ่มระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ทันที จากนั้นจึงนำตัวอย่างเข้าสู่เครื่อง Flow cytometer เพื่อวัดความเข้มของแสงเรืองจากเกล็ดเลือดแต่ละเซลล์ เครื่อง Flow cytometer จะปล่อยแสงเลเซอร์ผ่านเกล็ดเลือดทีละเซลล์ และตรวจจับความเข้มของแสงเรืองสีเขียวที่สะท้อนถึงระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ข้อมูลที่ได้สามารถแสดงในรูปแบบของกราฟหรือฮิสโตแกรม เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของความเข้มแสงก่อนและหลังการกระตุ้น (Assinger et al., 2015) ทั้งนี้ การกำหนดบริเวณของเกล็ดเลือดในแผนภูมิ มักอาศัยสัญญาณจากขนาดเซลล์ (forward scatter, side scatter) หรืออาจใช้สารย้อมจำเพาะต่อเกล็ดเลือด เช่น CD41 หรือ CD61 เพื่อยืนยันชนิดเซลล์ ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงระดับ Ca^{2+} ได้อย่างรวดเร็วในเซลล์จำนวนมาก ให้ข้อมูลระดับเซลล์เดี่ยว (single-cell analysis) และเหมาะสำหรับการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับการกระตุ้นหรือการทดลองแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม การใช้สารเรืองแสงแบบความยาวคลื่นเดียว เช่น Fluo-4 AM ให้เพียงค่าความเข้มแสงเชิงเปรียบเทียบ ไม่สามารถระบุค่าความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่แท้จริงได้

เนื่องจากอาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่น เช่น ความแตกต่างของการย้อมสี การรั่วของสารเรืองแสง หรือการเสื่อมสภาพของสัญญาณ (Jávega et al., 2023)

9. วิธี light transmission aggregometry (LTA)

เป็นการตรวจการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองโดยกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วยสารกระตุ้น วิธีนี้สามารถบอกความผิดปกติของเกล็ดเลือดเชิงลึกได้ทั้งความผิดปกติในการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิรวมถึงการหลั่งสารจากแกรนูลของเกล็ดเลือด โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ส่องผ่านหลอดทดลองใน platelet rich plasma (PRP) เทียบกับ platelet poor plasma (PPP) เมื่อเกล็ดเลือดได้รับการกระตุ้นจากสารกระตุ้นต่าง ๆ เช่น ADP, collagen จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือด การปลดปล่อยสารภายในแกรนูล และการกระตุ้นตัวรับ GPIIb/IIIa ซึ่งสามารถจับกับ fibrinogen ทำให้เกิดการเชื่อมโยงระหว่างเกล็ดเลือดและนำไปสู่การเกาะกลุ่ม (Z. Li, Delaney, O'Brien, & Du, 2010) การกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วย collagen, ADP มีกลไก (Nakamura, Kambayashi, Okuma, & Tandon, 1999) ดังนี้

การเกาะติด ตัวรับหลักบนเกล็ดเลือดที่จับกับ collagen ได้แก่ GPVI เป็นตัวรับสัญญาณที่สำคัญมากเมื่อ GPVI จับ collagen จะส่งสัญญาณเข้าสู่ภายในเซลล์เกล็ดเลือดเพื่อกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมต่าง ๆ GPIIb/IIIa มีบทบาทช่วยยึดเกล็ดเลือดให้แน่นขึ้น และอาจส่งสัญญาณเพิ่มเสถียรภาพให้ thrombus ส่งสัญญาณภายใน เมื่อตัวรับ GPVI ถูกกระตุ้นจะมีการนำเข้าสู่เซลล์ของ Ca^{2+} และกระตุ้นเส้นทางผ่าน PKC ซึ่งจำเป็นต่อการเปิดใช้งานตัวรับอื่น ๆ เช่น GPIIb/IIIa เส้นทางสัญญาณเหล่านี้ทำให้เกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลง และเตรียมพร้อมที่จะหลั่งสารสำคัญ

การหลั่งสาร เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะปล่อยสารสื่อ เช่น ADP, TXA_2 และอื่น ๆ ซึ่งช่วยกระตุ้นเกล็ดเลือดรอบข้างให้เข้ามาเกาะกลุ่มเพิ่มเติมสารเหล่านี้เป็นตัวเร่งให้การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดขยายมากขึ้น ภายหลังกการส่งสัญญาณภายในเกล็ดเลือด ตัวรับ GPIIb/IIIa จะถูกเปิดใช้งาน ทำให้สามารถจับกับ fibrinogen ซึ่งเป็นสะพานเชื่อมระหว่างเกล็ดเลือดหลายตัวเข้าด้วยกัน การจับ fibrinogen – GPIIb/IIIa นี้เป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มแบบเต็มรูปแบบของเกล็ดเลือด

การเกาะกลุ่ม เมื่อเกล็ดเลือดหลายตัวเชื่อมกันผ่าน fibrinogen ที่จับกับ GPIIb/IIIa ก็จะมีการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด การกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดย ADP เป็นสารกระตุ้นสำคัญที่หลั่งออกมาจาก dense granules ของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น และสามารถกระตุ้นเกล็ดเลือดอื่น ๆ ผ่านการจับกับ $P2Y_1$ และ $P2Y_{12}$ receptors บนผิวเซลล์เกล็ดเลือด (Gachet, 2001) การจับกับ $P2Y_1$ receptor จะกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มของแคลเซียมภายในเซลล์และทำให้เกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลง ส่วน $P2Y_{12}$ receptor มีบทบาทในการยับยั้ง adenylate cyclase ทำให้ระดับ cAMP ลดลง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น GPIIb/IIIa receptor และนำไปสู่การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่เสถียร (Zhang, Zhang, & Ding, 2016) ดังนั้น เส้นทางสัญญาณของ ADP ผ่านตัวรับ $P2Y$

จึงมีความสำคัญต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และเป็นเป้าหมายหลักของยาต้านเกล็ดเลือด เช่น clopidogrel และ ticagrelor การอ่านกราฟและการแปลผลการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของความขุ่น (optical density) หรือการส่งผ่านแสง (light transmission) ของพลาสมาที่มีเกล็ดเลือด PRP ขณะถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้น ต่าง ๆ เช่น ADP AA collagen หรือ thrombin (Born, 1962; Michelson, 2009) เมื่อเกล็ดเลือดเริ่มเกาะกลุ่มกัน ความขุ่นของสารละลายจะลดลง และค่าการส่งผ่านแสงจะเพิ่มขึ้น เครื่องจะบันทึกผลเป็นกราฟที่เรียกว่า aggregation curve ซึ่งสามารถใช้แปลผลระดับการตอบสนองของเกล็ดเลือดต่อสารกระตุ้นได้ ลักษณะของกราฟการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมักมีลักษณะโค้งที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของการส่งผ่านแสงตามเวลา โดยแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะหลัก ได้แก่ (Cattaneo, 2009)

1. Primary wave (ระยะการเกาะกลุ่มระยะแรก) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังการเติมสารกระตุ้นเป็นผลจากการตอบสนองโดยตรงของตัวรับ เช่น การจับของ ADP กับ P2Y₁ receptor หากสารกระตุ้นมีความเข้มข้นต่ำกราฟมักจะแสดงเฉพาะระยะนี้เท่านั้น

2. Secondary wave (ระยะการเกาะกลุ่มระยะที่สอง) เกิดขึ้นต่อเนื่องจากระยะแรก โดยเกิดจากการปลดปล่อยสารกระตุ้นภายในเกล็ดเลือดเอง เช่น ADP, TXA₂, serotonin แสดงถึงกระบวนการ release reaction และการขยายสัญญาณการเกาะกลุ่ม การปรากฏของระยะนี้บ่งบอกว่าเกล็ดเลือดมีการทำงานสมบูรณ์และเกิดการกระตุ้นภายในอย่างต่อเนื่อง ในกรณีที่ใช้สารกระตุ้น AA จะได้กราฟการเกาะกลุ่มแบบ single wave เพราะการตอบสนองขึ้นอยู่กับ การสร้าง TXA₂ เพียงอย่างเดียวผ่านเส้นทาง COX-1 pathway (Lordkipanidzé et al., 2007) การแปลผลกราฟการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด สามารถพิจารณาได้จากลักษณะของเส้นกราฟและค่าทางตัวเลข (Michelson, 2009) ดังนี้

ค่าร้อยละของการเกาะกลุ่มสูงสุด (Maximum aggregation; % Aggregation) เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถของเกล็ดเลือดในการเกาะกลุ่มเมื่อได้รับการกระตุ้น หากค่าต่ำแสดงว่าเกล็ดเลือดตอบสนองต่อสารกระตุ้นได้น้อย ระยะเวลาเริ่มต้นของการเกาะกลุ่ม (Lag time) หมายถึง เวลาตั้งแต่เริ่มเติมสารกระตุ้นจนเริ่มเกิดการเพิ่มของการส่งผ่านแสง ระยะเวลาที่สัมพันธ์กับความไวของเกล็ดเลือดต่อสารกระตุ้น

รูปร่างของเส้นกราฟ กราฟที่มีลักษณะโค้งขึ้นอย่างต่อเนื่องแสดงว่าเกล็ดเลือดมีการเกาะกลุ่มที่เสถียร หากกราฟเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแล้วกลับลดลงอย่างรวดเร็วแสดงว่าการเกาะกลุ่มไม่เสถียรหรือเกิดเพียงชั่วคราว (reversible aggregation) กราฟที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนแสดงว่าเกล็ดเลือดไม่ตอบสนองต่อสารกระตุ้น ซึ่งอาจเกิดจากฤทธิ์ของยาต้านเกล็ดเลือดหรือความผิดปกติของตัวรับ

10. การศึกษาการหดตัวของลิ่มเลือด (Clot retraction)

การหดตัวของลิ่ม เป็นกระบวนการก่ตัวของลิ่มเลือด โดยเป็นผลจากการทำงานร่วมกันของเกล็ดเลือด เส้นใย fibrin และโครงสร้าง cytoskeleton ภายในเกล็ดเลือด กระบวนการนี้มีบทบาทสำคัญต่อการทำให้ลิ่มเลือดมีความแข็งแรง เสถียร และช่วยในการสมานแผลในระดับโมเลกุล การหดตัวของลิ่มเลือดเริ่มจากการที่ fibrin จับกับ GPIIb/IIIa บนผิวเกล็ดเลือดส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณแบบ outside-in signaling ซึ่งกระตุ้นการจัดเรียงตัวของระบบ cytoskeleton ภายในเซลล์ โดยเฉพาะ actin และ myosin ทำให้เกิดแรงหดตัวที่ดึงเส้นใย fibrin เข้าหากันส่งผลให้ลิ่มเลือดมีขนาดเล็กลงและมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น โดย Thrombosthenin เป็นโปรตีนเชิงโครงสร้างภายในเกล็ดเลือด ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับ actomyosin complex ในเซลล์กล้ามเนื้อ มีบทบาทสำคัญในการสร้างแรงหดตัวภายในเซลล์ และเป็นกลไกหลักของกระบวนการ clot retraction (Durrant, van den Bosch, & Hers, 2017)

ไตรเทอร์พีนอยด์ (Triterpenoids) และบทบาทต่อการทำงานของเกล็ดเลือด

ไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นกลุ่มสารธรรมชาติชนิดสำคัญที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นสเตอรอยด์เหมือนโครงสร้าง C30 (สามมิติของห่วงคาร์บอน 30 อะตอม) พบได้ในพืช ฟังไจ และสัตว์ทะเลใน รูปแบบของ aglycones หรือที่ต่อด้วยหมู่คาร์โบไฮเดรตกลายเป็น triterpene saponins ซึ่งแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย เช่น ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง ด้านจุลชีพ และมีการศึกษาที่ชี้ว่าสารกลุ่มนี้สามารถปรับเปลี่ยนระบบการแข็งตัวของเลือดและการทำงานของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมางานวิจัยทั้งการแยกสารจากพืชและการทดสอบชีวภาพได้พบว่าไตรเทอร์พีนอยด์ และซาโปนิน (saponins) สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ (Olas, Urbanińska, & Bryś, 2020)

ในปี 2004 คุณจิน และคณะ ได้ศึกษาผลของสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์เพนตาไซคลิก 5 ชนิดที่แยกด้วยสารสกัดเมทานอลจากใบแคมป์ชิส แกรนดิฟลอร่า พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอพิเนฟรินได้เทียบเท่ากับกรตอะซิติลซาลิไซลิก (Jin et al., 2004)

ปี 2007 คุณ Huang และคณะ ได้ศึกษาและพบว่าสารไตรเทอร์พีนอยด์โดยเฉพาะ triterpene saponins เป็นกลุ่มสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดผ่านกลไกหลายทาง ได้แก่ การรบกวนสัญญาณ ADP/P2Y₁₂ การเพิ่ม cAMP/cGMP การยับยั้ง COX-1/TxA₂ pathway และการลดการทำงานของ GPIIb/IIIa ผลการศึกษา *in vitro* จากงานวิจัยหลายฉบับพบว่าสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้และขึ้นกับความเข้มข้นของสาร ทั้งนี้การนำสารดังกล่าวไปใช้ในมนุษย์ยังต้องศึกษาหาข้อมูลด้านความปลอดภัยและการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์เพิ่มเติมก่อนนำไปใช้จริง (H.-C. Huang et al., 2007)

ปี 2017 M. Li และคณะ ได้ศึกษาผลของสารซาโปนินไตรเทอร์พีนอยด์ใหม่ 5 ชนิด ที่ถูกแยกได้จากเหง้าของ *Panacis majoris* ได้แก่ สารประกอบ 1-5 ร่วมกับสารซาโปนินไตรเทอร์พีนอยด์ 4 ชนิด โดยสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในระดับปานกลางเมื่อกระตุ้นด้วย ADP โดยสารประกอบ 3 และ 5 แสดงค่า Inhibitory Concentration 50% (IC₅₀) ที่ 23.24 และ 18.43 μM ตามลำดับ นอกจากนี้สารประกอบ 5 ยังแสดงผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่เกิดจากกรดอะราคิโดนิคในระดับปานกลาง โดยมีค่า IC₅₀ ที่ 30.11 μM ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถยืนยันว่าสารซาโปนินไตรเทอร์พีนอยด์จาก *Panacis majoris* เป็นสารต้านการทำงานของเกล็ดเลือดเพื่อนำไปพัฒนาการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับเกล็ดเลือดต่อไป (M. Li et al., 2017)

ปี 2018 Lou และคณะ ได้ศึกษารากของสมุนไพร *Platycodon grandiflorum* (รากโป๊ยก็กจิน) พบ Platycodin D ซึ่งเป็นสารซาโปนินไตรเทอร์พีนอยด์ สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มและการกระตุ้นของเกล็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นหลายชนิด เช่น collagen, ADP, AA (Luo et al., 2018)

ปี 2020 Ampofo และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ของ Frondoside A (triterpenoid จาก sea cucumber) ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* เพื่อประเมินศักยภาพเป็นสารต้านการเกิดลิ่มเลือด (antithrombotic / antiplatelet) พบว่า Frondoside A ทำหน้าที่เป็น antiplatelet/antithrombotic agent โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นของเกล็ดเลือดและขัดขวาง signaling (PI3K→Akt/ERK) ที่จำเป็นต่อการเกาะกลุ่มและการสร้างลิ่มเลือด และมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นยาต้านลิ่มเลือดในอนาคต (Ampofo, Später, Nalbach, Menger, & Laschke, 2020)

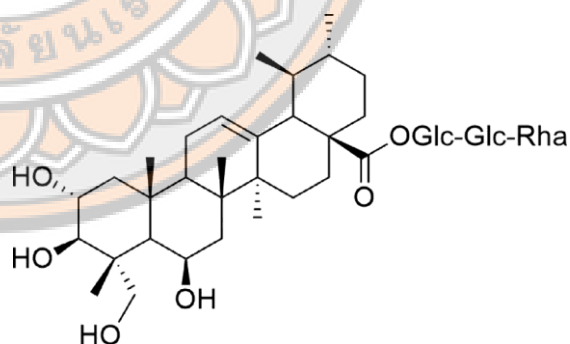
ปี 2023 Stawińska และคณะ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดรวม และ 4 เฟรคชัน (A–D) ที่แยกได้จากใบของ *Paulownia* Clone พบว่าความเข้มข้น 5 และ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถยับยั้งการแสดงออกของ GPIIb/IIIa บนผิวเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP และ collagen และพบว่าลดความสามารถในการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ (Stawińska, Rolnik, Stochmal, & Olas, 2023)

บัวบก

บัวบก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (L.) Urb. อยู่ในวงศ์ Apiaceae ชื่ออื่น เช่น ผักหนอก (ภาคเหนือ) ผักแว่น (ภาคใต้) พบได้ทั่วไปในเขตร้อน ในบริเวณ ทวีปเอเชีย ทวีปแอฟริกา ทวีปอเมริกา และหมู่เกาะต่างๆในมหาสมุทรแปซิฟิก เป็นพืชล้มลุก เลื้อยยาวไปตามพื้นดิน สารสำคัญในบัวบก ได้แก่ กลุ่มสารเทอร์พีนอยด์ มีสารประกอบ 2 กลุ่ม คือ 1) สารประกอบ โมโนและเซสควิเทอร์พีนอยด์ 2) สารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ ซึ่งสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ถูกพบมากที่สุดใบบัวบก โดยสามารถแยกสารหลักออกได้เป็น 4 ชนิด คือ มาติคาสโซไซด์ อะเซียติโคไซด์ กรดมาเดคาสสิก และกรดอะเซียติก

ในปี 2022 Poovizhi T และคณะ ได้ศึกษาใบบัวบกพบว่ามีสารประกอบไตรเทอร์พีนอยด์ และเอเซียติโคไซด์ ซึ่งมีส่วนช่วยในการต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยการสมานแผล ส่งเสริมการสร้างผิวใหม่ ชะลอวัย นอกจากนี้ ยังใช้ในการรักษาโรคทางระบบประสาท ระบบต่อมไร้ท่อ ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบทางเดินอาหาร ภูมิคุ้มกัน และโรคทางนรีเวช โดยการศึกษาทางคลินิกพบว่าสามารถต้านการอักเสบ ต่อด้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการเกิดอะพอโทซิส รักษาโรคผิวหนัง ช่วยบำรุงสมอง และช่วยลดความเครียดได้ ปัจจุบันมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยทางคลินิกเพิ่มเติมเพื่อยืนยันประสิทธิผลและความปลอดภัยสำหรับอาการทางการแพทย์เฉพาะต่อไป แสดงดังภาพ 8

ในปี 2015 เรียร์วัฒน์ และคณะ ได้ศึกษาผลจากสารมาติคาสโซไซด์ที่สกัดได้จากใบบัวบกต่อการเสริมฤทธิ์ยา aspirin เพื่อต้านการทำงานของเกล็ดเลือด พบว่ามาติคาสโซไซด์สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและเมื่อนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 และ 200 μM ผสมกับยา aspirin ที่มีความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่ง และพบว่าให้ผลการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ใกล้เคียงกับการใช้ยา aspirin เพียงอย่างเดียวซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ในการลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาสำหรับผู้ป่วยได้ (Kraikate et al., 2015) ทั้งนี้งานวิจัยดังกล่าวเป็นเพียงการศึกษาในเบื้องต้นและยังไม่ได้ทำการศึกษาผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดในเชิงลึกว่ามีกลไกเป็นอย่างไร



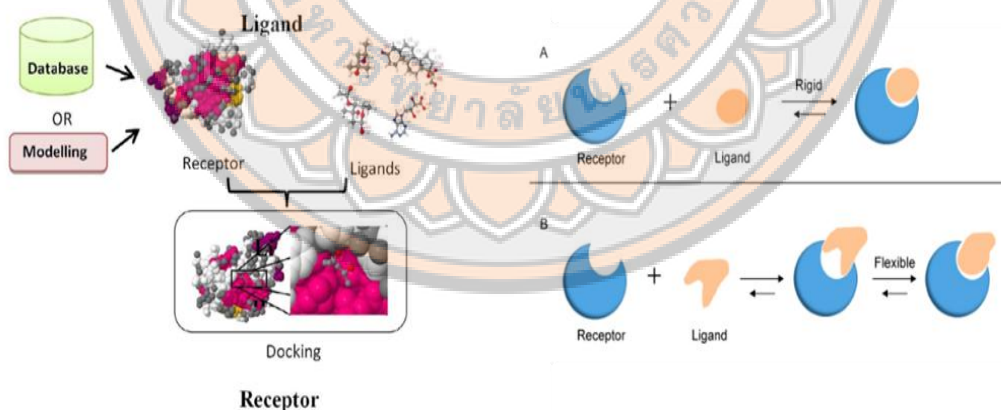
ภาพ 8 แสดงโครงสร้างของสารมาติคาสโซไซด์จากใบบัวบก

ที่มา: Kunjumon et al., 2020

โมเลกุลาร์ด็อกกิง

เป็นเทคนิคเชิงคำนวณ (computational technique) ที่ใช้ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลขนาดเล็ก (ligand) กับโปรตีนเป้าหมาย (target protein) เพื่อทำนายลักษณะการจับ (binding pose) เพื่อค้นหาสารยับยั้งต้นแบบหรือสารลิแกนด์ที่มีศักยภาพในการจับกับโปรตีนเป้าหมายหรือตัวรับที่กำหนด โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาและทำนายปฏิสัมพันธ์ของโมเลกุล รวมถึงการคาดการณ์ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ตำแหน่ง และทิศทางของการจับกัน การใช้วิธีนี้ช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ โดยการเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างสารยับยั้งกับโครงสร้างโปรตีนที่ตั้งไว้และใช้ค่าพลังงานการจับ (binding affinity) เพื่อวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างลิแกนด์และตัวรับ

ในขั้นต้น โมเดล "lock-and-key" เน้นการจับกันที่แน่นอนโดยที่ตัวรับและลิแกนด์ประกอบเข้าด้วยกันเหมือนกุญแจในล็อค อย่างไรก็ตาม การจับกันอาจมีความยืดหยุ่น ซึ่งนำไปสู่การพัฒนา "induced fit model" ที่พิจารณาการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของทั้งตัวรับและลิแกนด์เพื่อให้ได้โครงสร้างที่เสถียรที่สุดและลดพลังงานอิสระให้เหลือน้อยที่สุด โปรแกรมโมเลกุลาร์ด็อกกิงใช้อัลกอริธึมในการค้นหาโครงสร้างและการจัดเรียงที่เหมาะสมที่สุดพร้อมทั้งใช้ฟังก์ชันการให้คะแนนเพื่อทำนายความเข้ากันได้และวิเคราะห์รูปแบบของการปฏิสัมพันธ์ (Jiyu Fan, Fu, & Zhang, 2019) แสดงดังภาพ 9



ภาพ 9 แสดงทฤษฎีและขั้นตอนการศึกษาอันตรกิริยาของลิแกนด์และรีเซปเตอร์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง

ที่มา: Jiyu Fan et al., 2019

เทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในสาขาเคมีชีวภาพ ชีววิทยาโมเลกุล และเภสัชวิทยา เนื่องจากสามารถช่วยคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องใช้เวลาหรือค่าใช้จ่ายสูงจากการทดลองจริง (Trott, & Olson, 2010) โมเลกุลาร์ดีอกกิ่งจึงกลายเป็นเครื่องมือสำคัญในกระบวนการออกแบบยาแบบมีเหตุผล และการค้นหายาใหม่ในยุคปัจจุบัน

ใช้หลักการพื้นฐานของการหาค่าพลังงานต่ำสุดที่เกิดจากการจับกันของโปรตีนและลิแกนด์ โดยจะคำนวณแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล เช่น พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอร์วาลส์ ปฏิสัมพันธ์แบบ hydrophobic และ π - π stacking เพื่อทำนายค่าทางการจับที่เสถียรที่สุด (Morris et al., 2009) กระบวนการทำโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง สามารถสรุปได้เป็น 5 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. การเตรียมโปรตีนเป้าหมาย (Receptor preparation) โปรตีนที่ใช้ในการจำลองส่วนใหญ่ได้มาจากฐานข้อมูล Protein Data Bank (PDB) ซึ่งจัดเก็บข้อมูลโครงสร้างสามมิติของโปรตีนที่ได้จากเทคนิค X-ray crystallography หรือ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy (Berman et al., 2000) ก่อนนำมาใช้จำเป็นต้องลบโมเลกุลน้ำที่ไม่จำเป็น เดิมไฮโดรเจน และปรับประจุของกรดอะมิโนให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม

2. การเตรียมลิแกนด์ (Ligand preparation) ลิแกนด์สามารถนำมาจากฐานข้อมูล PubChem, ChEMBL หรือสร้างขึ้นใหม่โดยใช้โปรแกรมเช่น ChemSketch หรือ MarvinSketch จากนั้นจึงแปลงไฟล์เป็นรูปแบบที่ใช้ในการ docking เช่น .pdbqt โดยใช้โปรแกรม AutoDockTools หรือ Open Babel

3. การกำหนดบริเวณการจับ (Grid box setting) เป็นการระบุตำแหน่งที่คาดว่าลิแกนด์จะเข้าจับกับโปรตีน เช่น บริเวณ active site หรือ pocket ที่เป็นจุดเกิดปฏิกิริยาการจำลองการจับ ใช้โปรแกรมคำนวณ เช่น AutoDock Vina, AutoDock 4, DockThor, หรือ SwissDock เพื่อสร้างแบบจำลองของการจับระหว่างโปรตีนและลิแกนด์ โดยโปรแกรมจะประเมินค่าพลังงานการจับ (binding affinity, kcal/mol) เพื่อระบุค่าทางการจับที่มีความเสถียรสูงสุด (Forli et al., 2016; Trott & Olson, 2010)

4. การจำลองการจับ ใช้โปรแกรมคำนวณ เช่น AutoDock Vina, AutoDock 4, DockThor, หรือ SwissDock เพื่อสร้างแบบจำลองของการจับระหว่างโปรตีนและลิแกนด์ โดยโปรแกรมจะประเมินค่าพลังงานการจับ (binding affinity, kcal/mol) เพื่อระบุค่าทางการจับที่มีความเสถียรสูงสุด (Trott, & Olson, 2010)

5. การวิเคราะห์ผลลัพธ์ จะใช้โปรแกรมเช่น PyMOL, Discovery Studio Visualizer, หรือ LigPlot+ เพื่อดูโครงสร้างการจับระหว่างโปรตีนและลิแกนด์ ตรวจสอบชนิดของพันธะ และตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีส่วนร่วมในการจับ (Forli et al., 2016)

ในปี 2014 Zhang และคณะ ได้ค้นหาและระบุโครงสร้างผลึก ของ P2Y₁₂ ขณะจับ agonist สองชนิด คือ 2MeSADP analogue ของ ADP และ 2MeSATP ATP derivative ที่อาจทำงานเป็น partial-agonist สิ่งที่น่าสนใจ คือ โครงสร้างกลไกการจับลิแกนด์กระเปาะ (binding pocket) และตำแหน่งการจับลิแกนด์ของ 2MeSADP จับ pocket ภายใน transmembrane domain ของ P2Y₁₂ โดยมีการเชื่อมโยงผ่าน hydrogen bonds salt bridges และ π - π interaction กับ key residues รวมถึง interaction ที่ไม่เคยถูกระบุมาก่อนว่าเกี่ยวข้องกับ agonist binding เมื่อนำโครงสร้าง agonist-bound มาเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่จับ antagonist พบว่า agonist binding ทำให้เกิด rearrangement ครั้งใหญ่ใน extracellular region ของ receptor การเคลื่อนไหวส่วนของ helices (helix VI & VII) โดยเฉพาะย้ายตั้งด้าน extracellular ของ helices เหล่านี้ไปยังกลาง transmembrane domain ผลงานของ Zhang และคณะ จึงสามารถตอบคำถามเกี่ยวกับ molecular basis ของการจดจำ agonist ที่จับ P2Y₁₂ ซึ่งก่อนหน้านี้มีเพียงการศึกษาด้วย modelling / mutagenesis แต่ไม่มีโครงสร้าง 3 มิติจริง

เทคนิค Molecular Dynamics Simulation (MD Simulation)

เป็นเครื่องมือทางคอมพิวเตอร์ที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนไหวของอะตอมและโมเลกุลในช่วงเวลาจำลอง โดยอาศัยหลักการของกลศาสตร์คลาสสิก เพื่อคำนวณแรง และพลังงานศักย์ ระหว่างอะตอมแต่ละตัวในระบบ ซึ่งช่วยให้นักวิจัยสามารถเข้าใจพฤติกรรมเชิงพลวัตของโปรตีนและโมเลกุลที่จับกับโปรตีนนั้นได้อย่างละเอียด (Badar, Shamsi, Ahmed, & Alam, 2022) ในงานด้านชีวโมเลกุล MD Simulation มักถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความมั่นคงของการจับระหว่าง ligand (เช่น ยา หรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ) กับ P2Y₁₂ receptor ซึ่งเป็นตัวรับ GPCR ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และเป็นเป้าหมายหลักในการพัฒนายาต้านเกล็ดเลือด เช่น clopidogrel และ ticagrelor (Dimofte, 2022) การจำลอง Madecassoside (MD) จะช่วยให้สามารถสังเกตได้ว่า ligand ยังคงจับอยู่ที่ตำแหน่งเดิมของโปรตีนหรือไม่ และมีความมั่นคงเพียงใดตลอดระยะเวลาจำลอง (เช่น 50–100 นาโนวินาที) โดยข้อมูลที่ได้จากการจำลองสามารถนำมาวิเคราะห์ผ่านค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้แก่

1. Root Mean Square Deviation (RMSD): ใช้วัดความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนและคอมเพล็กซ์โปรตีน-ลิแกนด์ เมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างเริ่มต้น ยิ่งค่า RMSD เปลี่ยนแปลงน้อย แสดงว่าการจับมีเสถียรภาพสูง (Durrant, & McCammon, 2011)
2. Root Mean Square Fluctuation (RMSF): แสดงระดับการเคลื่อนไหวของกรดอะมิโนแต่ละตำแหน่ง เพื่อระบุบริเวณที่มีความยืดหยุ่นของโปรตีน

3. Radius of Gyration (Rg): ใช้วัดความกระชับของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งสัมพันธ์กับความมั่นคงของโครงสร้างโดยรวม

4. Hydrogen Bond Analysis: วิเคราะห์จำนวนและระยะเวลาการคงอยู่ของพันธะไฮโดรเจนระหว่างลิแกนด์กับ P2Y₁₂ receptor เพื่อประเมินความแข็งแรงของการจับ

ผลการจำลอง MD ที่มีค่า RMSD และ Rg คงที่ รวมถึงมีพันธะไฮโดรเจนจำนวนมากและคงอยู่ในช่วงเวลาจำลอง แสดงว่าการจับระหว่างลิแกนด์กับ P2Y₁₂ receptor มีความมั่นคงและมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง (Halim et al., 2022) ดังนั้น การใช้เทคนิค Molecular Dynamics Simulation จึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยยืนยันและเสริมความน่าเชื่อถือของผลการทำนายจากการทำ molecular docking โดยสามารถอธิบายกลไกระดับอะตอมของการจับกันระหว่างลิแกนด์ และโปรตีนเป้าหมายได้อย่างแม่นยำและใกล้เคียงกับสภาวะจริงในร่างกาย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดในทุกกระบวนการ โดยจะทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด กระบวนการยึดติดระหว่างเกล็ดเลือดกับ extracellular matrix รวมถึงศึกษาโมเลกุลเป้าหมายในการจับกันระหว่างสารและโปรตีนที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิคทางเคมีคอมพิวเตอร์ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อทดแทนยาที่มีผลข้างเคียงต่อร่างกายผู้ป่วย นอกจากนี้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปสู่การวิจัยเพิ่มเติมเพื่อพัฒนายาใหม่สำหรับรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

ตาราง 1 แสดงวัตถุประสงค์ และแผนการทำงาน

วัตถุประสงค์	แผนการทำงาน
1. ทดสอบความเป็นพิษของสารมาติคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือด	1.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารมาติคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือดด้วยการวัดปริมาณ LDH
2. ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือด	2.1 ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยเครื่อง Aggregometer 2.2 ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับ fibrinogen 2.3 ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการหดตัวของลิ้มเลือด
3. ศึกษาโมเลกุลเป้าหมายในการเข้าจับกันระหว่างสารมาติคาสโซไซด์และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง	3.1 ศึกษาโมเลกุลเป้าหมายในการเข้าจับกันระหว่างสารมาติคาสโซไซด์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกกิ่ง

สารมาติคาสโซไซด์

สารมาติคาสโซไซด์ที่นำมาใช้ในการทดลอง เป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากใบบัวบก สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Aldrich ซึ่งผ่านกรรมวิธีการผลิตด้วยหลักการ HPLC ที่ระดับความบริสุทธิ์ของสารมากกว่าหรือเทียบเท่ากับ 95%

การเตรียมเกล็ดเลือดสำหรับการทดสอบ

ทำการเจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 3 คน อายุ 20 ปีขึ้นไป โดยมีเกณฑ์คัดเลือก ได้แก่ 1) ไม่มีภาวะซีดหรือโลหิตจาง 2) ไม่สูบบุหรี่ 3) ไม่ดื่มแอลกอฮอล์ 4) ไม่รับประทานยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) เช่น aspirin ibuprofen diclofenac naproxen piroxicam meloxicam celecoxib ภายในระยะเวลา 4 สัปดาห์ก่อนการศึกษา โดยใช้

สารกันเลือดแข็งชนิดโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) ความเข้มข้นร้อยละ 3.2 ในอัตราส่วนเลือดต่อสารกันเลือดแข็ง 9:1 นำตัวอย่างเลือดที่ได้ไปปั่นแยกที่ความเร็ว 140 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกเก็บส่วนของเหลวด้านบนซึ่งเป็นเกล็ดเลือดเข้มข้น (Platelet-Rich Plasma; PRP) ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที ต่อมานำ PRP ไปปั่นที่ความเร็ว 2,200 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสด้านบนและเติมสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย Tyrode's albumin ที่มี 10 U/mL heparin และ 0.5 μM PGI₂ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที ภายหลังจากนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,900 g เป็นเวลา 8 นาที และทำการล้างเกล็ดเลือดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากทิ้งส่วนใสด้านบนแล้ว เติม Tyrode's albumin ที่มี 0.02 U/mL apyrase และปรับความเข้มข้นของเกล็ดเลือดให้อยู่ที่ 3×10^8 cells/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (Cazenave et al., 2004)

ทดสอบความเป็นพิษของสารมาติคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือดด้วยการวัดปริมาณ LDH

เพื่อประเมินว่าสารมาติคาสโซไซด์มีความเป็นพิษต่อเกล็ดเลือดหรือไม่ ได้ทำการตรวจวัดปริมาณ LDH ที่หลั่งออกมาจากเกล็ดเลือดซึ่งถูกทำลาย โดยเตรียมตัวอย่างเกล็ดเลือดที่ปั่นล้างแล้วที่ปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 3×10^8 cells/ml ปริมาตร 500 μL จากนั้นทำปฏิกิริยาร่วมกับสารมาติคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 μM บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ภายหลังจากบ่มทำการปั่นที่ความเร็ว 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส (supernatant) นำไปตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ LDH ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas c311 ทั้งนี้ ใช้สาร Triton X-100 เป็นกลุ่มควบคุมบวกและใช้สารละลาย 0.1% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) เป็นกลุ่ม vehicle control

ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

เพื่อการศึกษาผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ทำการทดสอบในตัวอย่างเกล็ดเลือดที่ปั่นล้างแล้ว โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม 0.1% DMSO และ กลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซด์ในความเข้มข้น 200 และ 400 μM ภายใต้อุณหภูมิเดียวกัน การกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดกระทำโดยใช้สารกระตุ้น 2 ชนิด ได้แก่ 5 μM ADP และ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ collagen ทำการวัดการเปลี่ยนแปลงของการส่องผ่านแสง (light transmission) ด้วยเครื่อง platelet aggregometer (APACT 4004, Haemochrome Diagnostica, Germany) ซึ่งสัมพันธ์กับระดับการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด โดยรายงานผลเป็นร้อยละของการเกาะกลุ่ม (% aggregation)

ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซค์ต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือด

เพื่อศึกษาผลของสารมาติคาสโซไซค์ต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

ทำการเตรียมสไลด์แก้วโดยเคลือบด้วยสาร fibrinogen และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม คือ นำตัวอย่างเกล็ดเลือดที่ปั่นล้างแล้วทำปฏิกิริยากับสารละลาย 0.1% DMSO เป็นเวลา 5 นาที

2. กลุ่มทดลอง คือ นำเกล็ดเลือดที่ปั่นล้างแล้ว ทำปฏิกิริยาสารมาติคาสโซไซค์ ที่ความเข้มข้น 400 μM เป็นเวลา 5 นาที

จากนั้น เติมตัวอย่างลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วย fibrinogen และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้ว ทำการตรึงเซลล์ด้วยสาร Paraformaldehyde และทำการย้อมสีเกล็ดเลือดด้วยสารเรืองแสงจำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างภายในเกล็ดเลือด ดังนี้

1. Anti-tubulin conjugate Fluorescence 488 แสดงถึงโครงสร้าง microtubules
2. Anti-myosin conjugate Fluorescence 647 แสดงถึงแรงหดตัวและการจัดระเบียบของ myosin ภายหลังการเกาะติด
3. Anti-phalloidin conjugate Fluorescence 555 แสดงถึงระดับการกระตุ้นและการแผ่ตัวของเกล็ดเลือดผ่านการจับกับ F-actin

ทำการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 และบันทึกผลการเกาะติดของเกล็ดเลือดโดยใช้โปรแกรม ImageJ เพื่อคำนวณค่าพื้นที่การแผ่ขยายและประเมินการจัดเรียงของโครงสร้าง cytoskeleton ของเกล็ดเลือด

ทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซค์ต่อการหดตัวของลิ่มเลือด

เพื่อทดสอบผลของสารมาติคาสโซไซค์ต่อการเกิด Clot retraction ซึ่งเป็นการทำหน้าที่ของเกล็ดเลือดในกระบวนการ secondary hemostasis โดยเกล็ดเลือดจะทำหน้าที่อุดกั้นลิ่มเลือดให้แน่นขึ้นผ่านการทำงานของโปรตีน Thrombostinin นำเกล็ดเลือดที่ปั่นล้างแล้ว มาทำปฏิกิริยากับสารมาติคาสโซไซค์ที่ความเข้มข้น 200 μM และ 400 μM นาน 5 นาที จากนั้นกระตุ้นให้เกิดลิ่มเลือดด้วย 0.025 mol/L CaCl_2 และสังเกตการหดตัวของลิ่มเลือดที่เวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณของพลาสมาที่อยู่นอกลิ่มเลือด และใช้โปรแกรม ImageJ ในการวัดขนาดของลิ่มเลือดที่เกิดการหดตัว รายงานผลเป็น % clot retraction โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ clot retraction} = \frac{(\text{initial clot area}) - (\text{final clot area at 24 hr})}{\text{initial clot area}} \times 100$$

ศึกษาโมเลกุลเป้าหมายของสารมาตีคาสโซไซต์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง

จากการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด พบว่าสารมาตีคาสโซไซต์มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งบ่งชี้ว่าสารมาตีคาสโซไซต์อาจมีผลต่อการทำงานของโปรตีนตัวรับ ADP หรือ P2Y₁₂ receptor ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์การยึดจับระหว่างสารมาตีคาสโซไซต์กับโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุล

โครงสร้างสามมิติของโปรตีน P2Y₁₂ ถูกดาวน์โหลดจากฐานข้อมูล PDB โดยเลือกใช้โปรตีนรหัส 4PXZ, 4PYO และ 4NTJ จากนั้นจัดเตรียมโครงสร้างโปรตีนด้วยโปรแกรม ChimeraX 1.8 และ BIOVIA Discovery Studio เพื่อกำจัดโมเลกุลน้ำและสารอื่น ๆ ออกจากโครงสร้างให้คงเหลือเฉพาะโปรตีน P2Y₁₂ สำหรับการวิเคราะห์ ในส่วนของลิแกนด์ได้ดาวน์โหลดโครงสร้างสามมิติของสารมาตีคาสโซไซต์จากฐานข้อมูล ChemSpider (ChemSpider ID: 28639016) รวมถึงลิแกนด์ในกลุ่มตัวยายับยั้ง P2Y₁₂ (P2Y₁₂ inhibitors) ได้แก่

1. โปรตีนรหัส 4PXZ มี 2-Methylthio-adenosine-5'-diphosphate (2MeSADP; CID: 121990) เป็น inhibitor
2. โปรตีนรหัส 4PYO มี 2-Methylthio-adenosine-5'-triphosphate (2MeSATP; CID: 5310983) เป็น inhibitor
3. โปรตีนรหัส 4NTJ มี Ethyl 6-[4-(Benzylsulfonylcarbamoyl)piperidin-1-yl]-5-cyano-2-methylpyridine-3-carboxylate (AZD1283; CID: 23649325) เป็น inhibitor
4. ticagrelor (CID: 9871419)

ลิแกนด์ทั้งหมดถูกจัดเตรียมและปรับโครงสร้างให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งานด้วยโปรแกรม ChimeraX 1.8 และ BIOVIA Discovery Studio เช่นเดียวกัน ทำการโมเลกุลาร์ด็อกกิงโดยใช้โปรแกรม SwissDock (Web-based tool) และ AutoDock Vina เพื่อจำลองการยึดจับระหว่างลิแกนด์และโปรตีนเป้าหมาย วิเคราะห์ตำแหน่งที่เหมาะสมของการจับ (binding site) และคำนวณค่าพลังงานอิสระในการยึดจับ (binding affinity) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดความเสถียรและความสามารถในการยึดจับกันของลิแกนด์กับโปรตีนเป้าหมาย

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทุกการทดสอบจะทำการวิเคราะห์แบบ 3 time independent และแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ One way ANOVA โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สำเร็จรูป SPSS version 21.0 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติมสารสกัด (Vehicle control) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



บทที่ 4

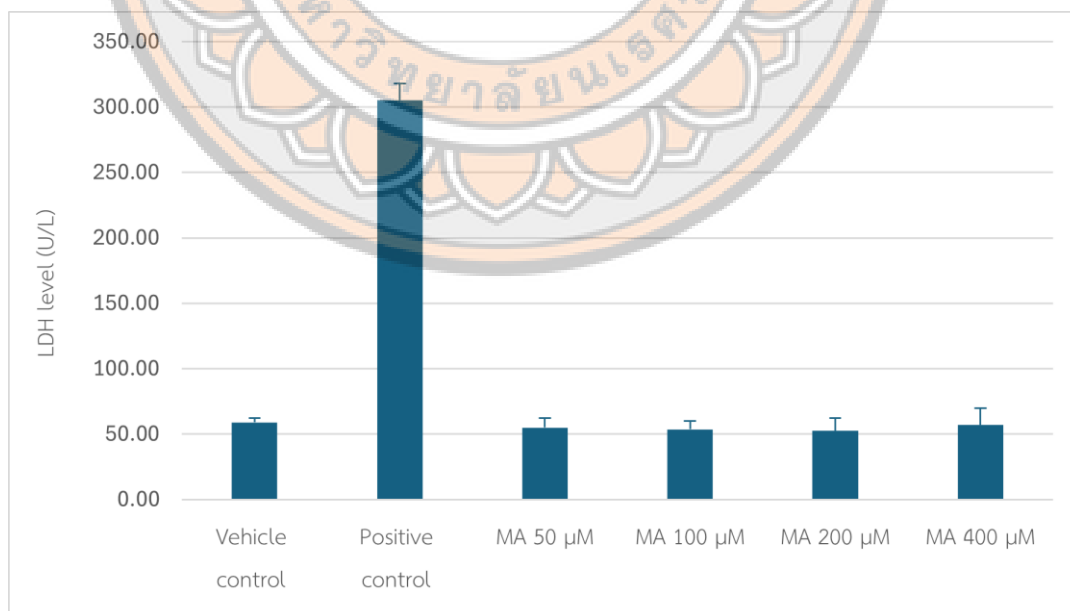
ผลการวิจัย

ผลทดสอบความเป็นพิษของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือด

1. ผลทดสอบความเป็นพิษของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือดด้วยการวัดปริมาณ LDH

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสารมาดีคาสโซไซด์ต่อเกล็ดเลือด โดยการวัดปริมาณ LDH ที่หลั่งออกมาจากเกล็ดเลือดเมื่อถูกทำลาย ทำการเติมเกล็ดเลือดร่วมกับสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 μM ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle control) โดยมีค่า LDH เฉลี่ยเท่ากับ 55.00 ± 7.00 , 53.52 ± 6.50 , 52.52 ± 9.50 และ 57.00 ± 12.73 U/L ตามลำดับ ($p > 0.05$) ขณะที่กลุ่ม positive control; Triton X-100 มีค่า LDH เฉลี่ยสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 305.00 ± 13.00 U/L ($p = 0.033$)

แสดงให้เห็นว่าสารมาดีคาสโซไซด์ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเกล็ดเลือดในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองนี้ แสดงดังภาพ 10



ภาพ 10 แสดงค่าความเป็นพิษของสารมาดีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเกล็ดเลือด โดยการวัดปริมาณ LDH, MA = madecassoside

ผลของสารมาติคาสโซไซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือด

1. ผลของสารมาติคาสโซไซไซด์ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

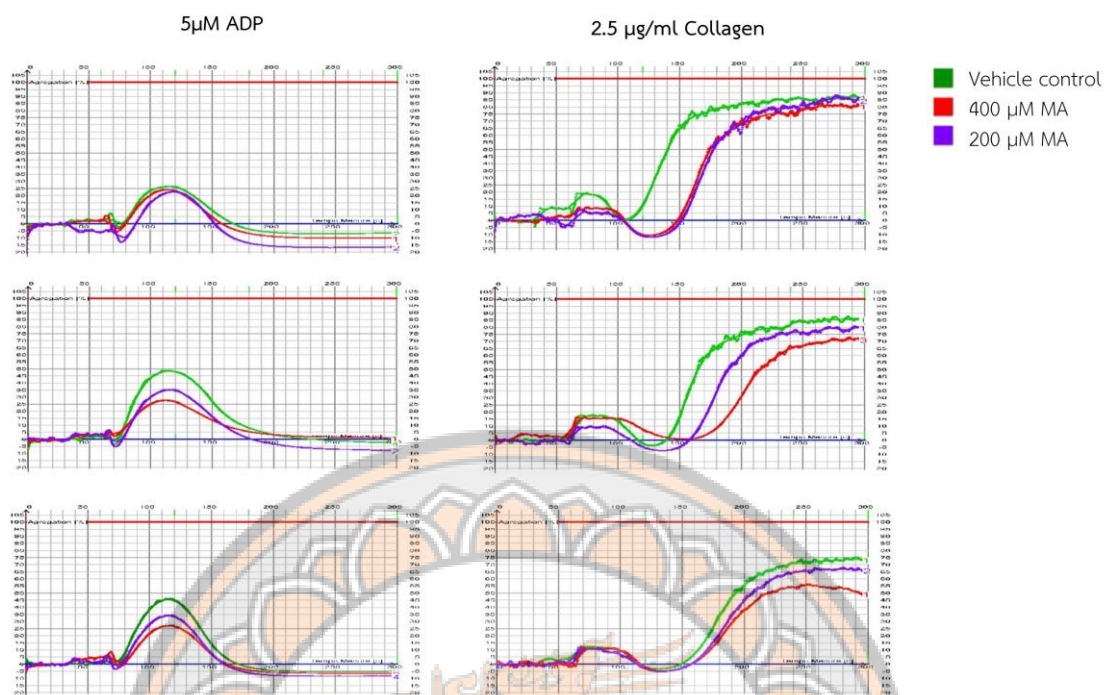
ผลจากการศึกษาสารมาติคาสโซไซไซด์ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ได้ทำการทดสอบในตัวอย่างเกล็ดเลือดโดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 μM ภายใต้สภาวะเดียวกัน การกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดกระทำโดยใช้สารกระตุ้น 2 ชนิด ได้แก่ 5 μM ADP และ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ collagen

การตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย 5 μM ADP

ผลการวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP พบว่าเส้นโค้งของทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 μM มีรูปแบบการตอบสนองคล้ายคลึงกันในรูปแบบ single wave เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μM ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดย้อยละ 36.75 ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.005$) ในขณะที่สารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 μM ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ ร้อยละ 26.17 มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังภาพ 11 (ซ้าย) และตาราง 1 พบว่าสารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μM ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ได้ดีกว่าความเข้มข้น 200 μM และมีแนวโน้มลดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในลักษณะ dose-dependent effect และอาจมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (anti-platelet aggregation activity) ผ่านกลไกที่เกี่ยวข้องกับ ADP receptor

การตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยคอลลาเจน (2.5 $\mu\text{g/ml}$)

ผลการวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย collagen พบว่าเส้นโค้งของทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซไซด์ ที่ความเข้มข้น 200 และ 400 μM มีรูปแบบการตอบสนองคล้ายคลึงกัน เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซไซด์ พบว่าสารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μM มีความสามารถในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดย้อยละ 15.66 ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p= 0.029$) ในขณะที่สารมาติคาสโซไซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 μM ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้เพียงร้อยละ 5.54 แสดงดังภาพ 11 (ขวา) และตาราง 1



ภาพ 11 แสดงผลของสารมาติคาสโซไซด์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 5 μM ADP (ซ้าย) และ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ collagen (ขวา) โดยมีกลุ่มควบคุมคือ 0.1% DMSO (เส้นสีเขียว) กลุ่มที่เติมสารมาติคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μM (เส้นสีแดง) และกลุ่มที่เติมสารมาติคาสโซไซด์ความเข้มข้น 200 μM (เส้นสีม่วง), MA = madecassoside

ตาราง 1 แสดงผล % aggregation และ % inhibition ของสารมาติคาสโซไซด์ ที่ความเข้มข้น 400 μM และ 200 μM เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 5 μM ADP และ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ collagen

Agonist	Test	% aggregation				% inhibition	p-value*
		sample 1	sample 2	sample 3	mean \pm SD		
5 μM ADP	Vehicle Control	30.01	48.77	45.47	41.42 \pm 10.02	-	-
	400 μM MA	24.00	27.65	26.95	26.20 \pm 1.94	36.75	0.005
	200 μM MA	22.54	35.14	34.05	30.58 \pm 6.98	26.17	0.124
2.5 $\mu\text{g/ml}$ collagen	Vehicle Control	87.38	86.32	74.31	82.67 \pm 7.26	-	-
	400 μM MA	81.37	72.03	55.77	69.72 \pm 12.95	15.66	0.029
	200 μM MA	86.78	80.28	67.20	78.09 \pm 9.97	5.54	0.373

* p-value เป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง MA และ Vehicle control

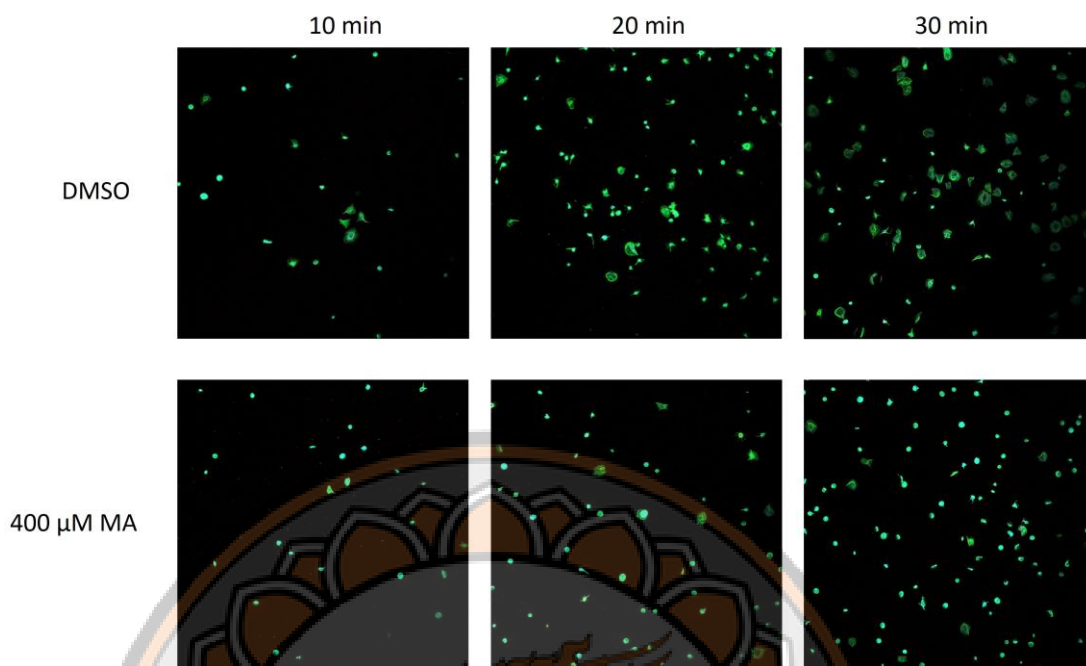
2. ผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือดกับ fibrinogen

โดยทำการทดสอบดังนี้

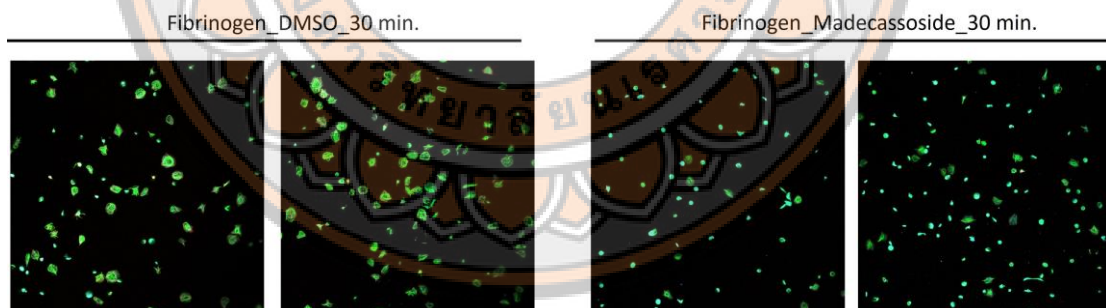
- 2.1 จำนวนของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen
- 2.2 ลักษณะรูปร่างของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen
- 2.3 พื้นที่การแผ่กระจายตัวของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen

2.1 จำนวนของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen

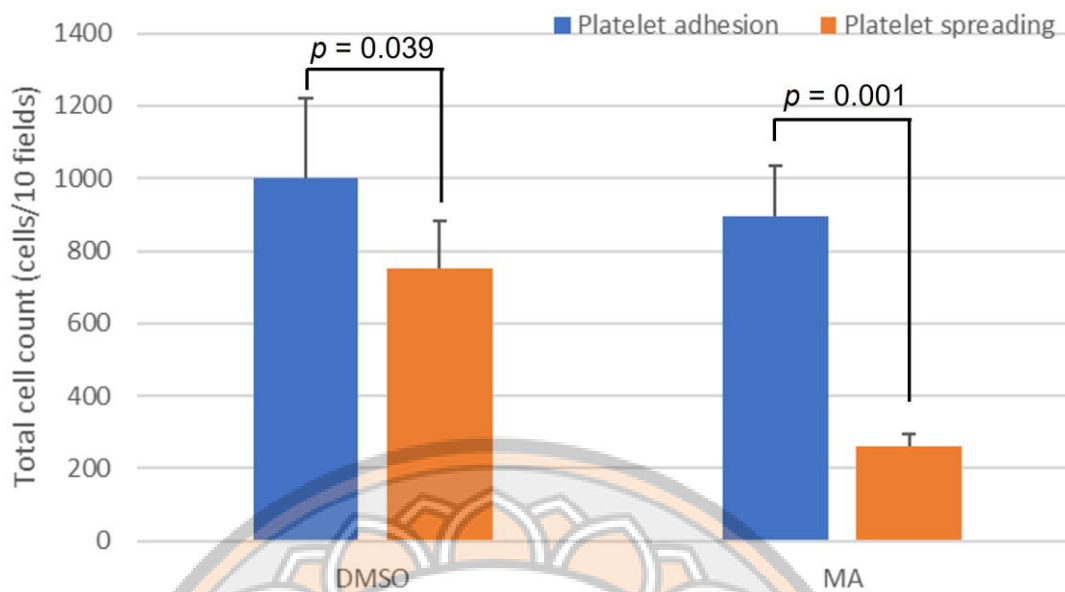
จากการศึกษาจำนวนเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen ในช่วงเวลาต่าง ๆ พบว่า ณ เวลา 30 นาที มีจำนวนเกล็ดเลือดที่เกาะติดกับ fibrinogen มากกว่าช่วงเวลา 10 นาที และ 20 นาที แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่มีผลต่อการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen แสดงดังภาพ 12-13 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มที่ได้รับ 0.1% DMSO (กลุ่มควบคุม) พบว่ามีจำนวนเกล็ดเลือดที่เกาะติดทั้งหมดเฉลี่ย 1,002 เซลล์ต่อ 10 fields โดยมีเกล็ดเลือดที่เกิดการแผ่ขยายคิดเป็นร้อยละ 67.66 ของเซลล์ทั้งหมด และกลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μM พบว่ามีจำนวนเกล็ดเลือดเกาะติดเฉลี่ย 896 เซลล์ต่อ 10 fields โดยมีเกล็ดเลือดที่เกิดการแผ่ขยายเพียงร้อยละ 27.79 ของเซลล์ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้วพบว่า การเกาะติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ของทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.039$) แสดงดังภาพ 14 และเมื่อพิจารณาการแผ่ขยายของเกล็ดเลือด พบว่าในกลุ่มที่เติมสารมาติคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μM เกล็ดเลือดมีการแผ่ขยายลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.001$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารมาติคาสโซไซด์ยับยั้งการกระตุ้นและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดในกระบวนการเกาะติด โดยพบการยื่นแขนง (filopodia) และการแผ่ตัวของไฮโดพลาสซึมลดลงอย่างเด่นชัด แสดงดังภาพ 14



ภาพ 12 แสดงการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาตีคาสโไซไซด์ความเข้มข้น 400 μM ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ เวลา 10, 20 และ 30 นาที กำลังขยาย 100 เท่า



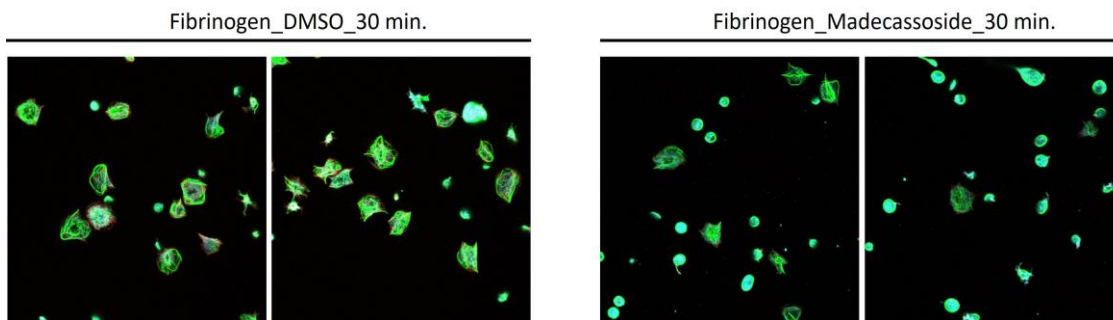
ภาพ 13 แสดงจำนวนการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาตีคาสโไซไซด์ความเข้มข้น 400 μM ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ เวลา 30 นาที กำลังขยาย 100 เท่า



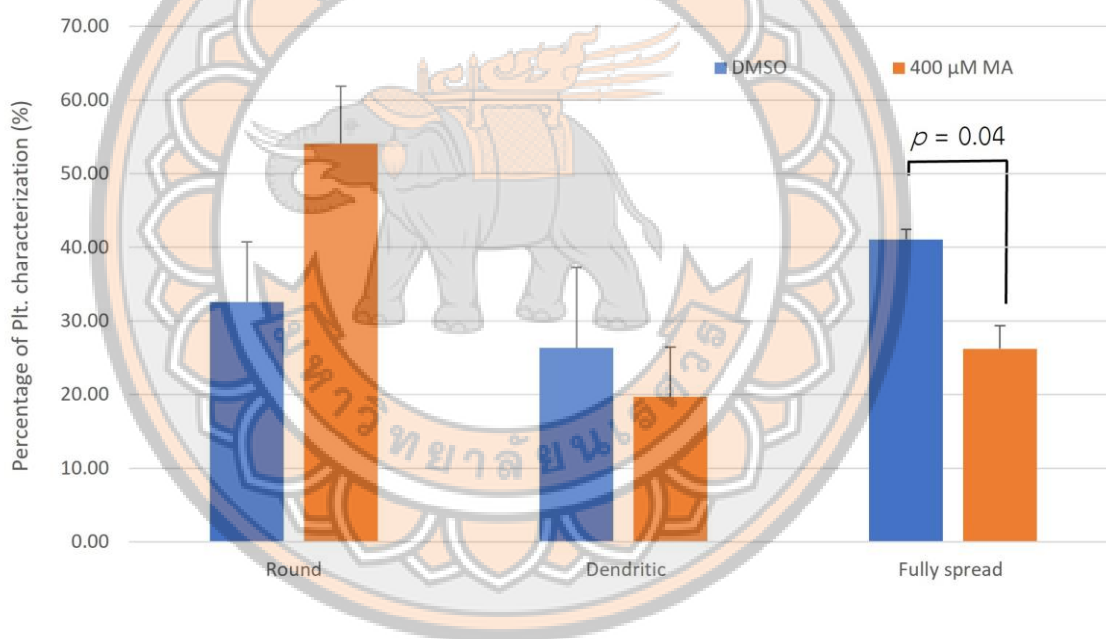
ภาพ 14 แสดงจำนวนการเกาะติดและการแผ่ขยายของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาติคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μ M ณ เวลา 30 นาที

2.2 ลักษณะรูปร่างของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen

หลังจากที่ทำการนับจำนวนของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen แล้วจึงทำการศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเกล็ดเลือดที่เกิดการเกาะติดภายใต้สภาวะการทดลองต่าง ๆ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จึงทำการย้อมเกล็ดเลือดด้วยสารเรืองแสงจำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างภายในเซลล์ ได้แก่ Tubulin, Myosin และ F-actin เพื่อประเมินลักษณะรูปร่างของเกล็ดเลือด จากการดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 พบว่าในกลุ่มควบคุม เกล็ดเลือดมีลักษณะรูปร่างอยู่ในระยะพัก (Round morphology) ร้อยละ 32.59 ระยะเริ่มยึดแขนง (Dendritic morphology) ร้อยละ 26.34 และระยะแผ่ขยายไซโตพลาสซึมอย่างสมบูรณ์ (Fully spread morphology) ร้อยละ 41.07 เกล็ดเลือดในกลุ่มที่เติมสารมาติคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μ M มีการยึดแขนงและมีการแผ่ขยายของไซโตพลาสซึมบนพื้นผิว fibrinogen ลดลงเมื่อทำการวิเคราะห์พบว่าเกล็ดเลือดมีรูปร่างอยู่ในระยะพักร้อยละ 54.10 ระยะเริ่มยึดแขนงร้อยละ 19.67 และระยะแผ่ขยายไซโตพลาสซึมอย่างสมบูรณ์ ร้อยละ 26.23 แสดงดังภาพ 15-16 จะเห็นได้ว่าสารมาติคาสโซไซด์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดในกระบวนการเกาะติด โดยพบการลดลงของลักษณะรูปร่างเกล็ดเลือดในระยะแผ่ขยายไซโตพลาสซึมอย่างสมบูรณ์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.04$)



ภาพ 15 แสดงลักษณะรูปร่างของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุม และสารมาติคาลโซไซไซด์ความเข้มข้น 400 μM ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ เวลา 30 นาที กำลังขยาย 200 เท่า



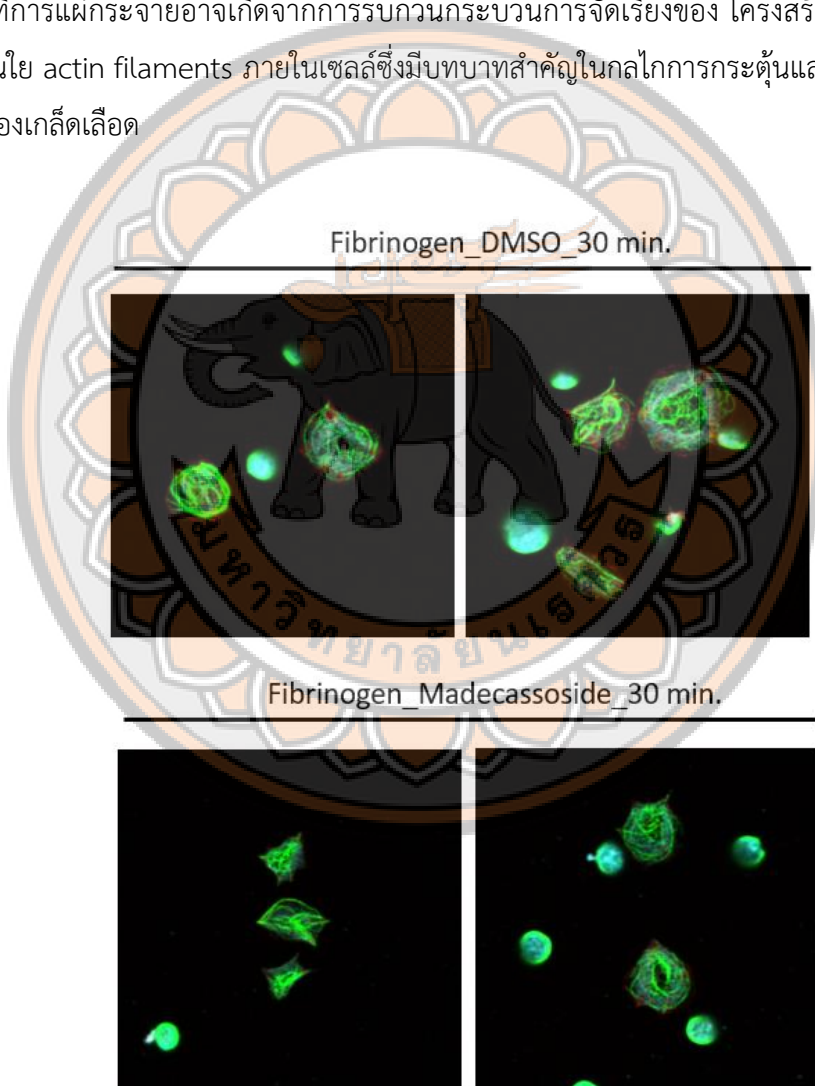
ภาพ 16 แสดงร้อยละของลักษณะรูปร่างของเกล็ดเลือดแต่ละชนิดที่เกาะติดอยู่บนพื้นผิว fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาติคาลโซไซไซด์ความเข้มข้น 400 μM ณ เวลา 30 นาที

2.3 พื้นที่การแผ่กระจายตัวของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen

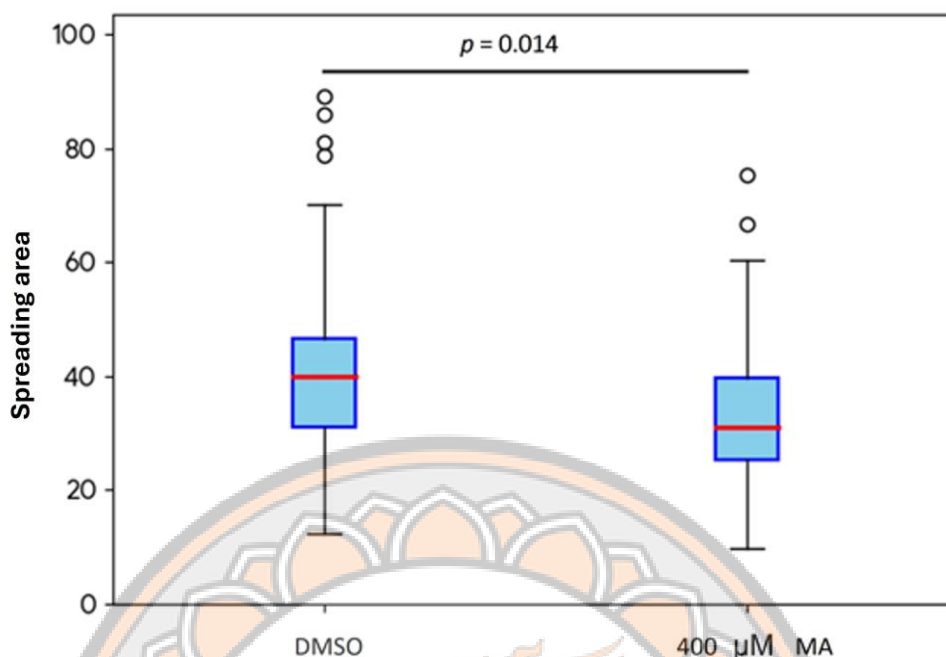
จากการศึกษาพื้นที่การแผ่กระจายของเกล็ดเลือด (platelet spreading area) บนพื้นผิว fibrinogen ในช่วงเวลา 30 นาที ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงจำเพาะต่อโปรตีนโครงสร้างภายในเซลล์ ได้แก่ Tubulin, Myosin และ F-actin โดยใช้โปรแกรม ImageJ เพื่อคำนวณค่าพื้นที่การแผ่ขยายและประเมินการจัดเรียงของโครงสร้าง cytoskeleton ของเกล็ดเลือด โดยวิเคราะห์จากการแผ่ขยายของ F-actin ซึ่งเป็นเส้นใยที่บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือด พบว่าในกลุ่มที่

ได้รับสารมาติคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μM เกล็ดเลือดมีลักษณะการแผ่ขยายบนพื้นผิว fibrinogen ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.014$) โดยส่วนใหญ่ของเกล็ดเลือดยังคงอยู่ในระยะ dendritic form ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการกระตุ้น แสดงให้เห็นถึงการยับยั้งบางส่วนของกระบวนการกระตุ้นเกล็ดเลือดและการจัดเรียงเส้นใย actin ภายในเซลล์ แสดงดังภาพ 17-18

แสดงให้เห็นว่าสารมาติคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μM มีฤทธิ์ยับยั้งการแผ่กระจายของเกล็ดเลือดบนพื้นผิว fibrinogen โดยไม่ส่งผลกระทบต่อจำนวนเกล็ดเลือดที่ยึดเกาะการลดลงของพื้นที่การแผ่กระจายอาจเกิดจากการรบกวนกระบวนการจัดเรียงของ โครงสร้าง microtubules และ เส้นใย actin filaments ภายในเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกลไกการกระตุ้นและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือด



ภาพ 17 แสดงการแผ่ขยายของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิวที่เคลือบด้วย fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาติคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μM ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ ณ เวลา 30 นาที กำลังขยาย 360 เท่า



ภาพ 18 แสดงพื้นที่การแผ่ขยายของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิวที่เคลือบด้วย fibrinogen ในกลุ่มควบคุมและสารมาติคาสโซไซด์ความเข้มข้น 400 μM ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ชนิด Confocal microscope, LEICA TCS SP8 ณ เวลา 30 นาที

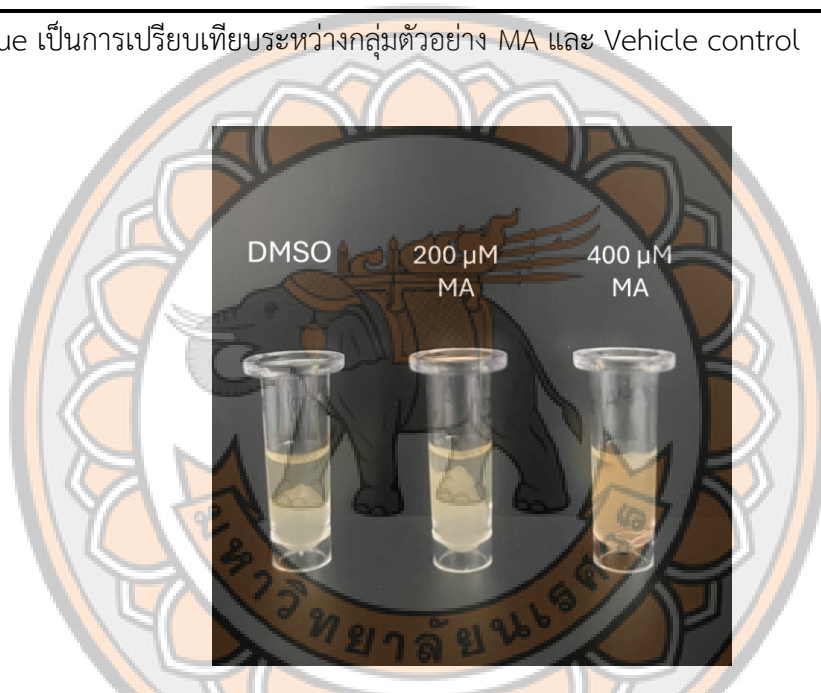
ผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการหดตัวของลิ่มเลือด

จากการศึกษาผลของสารมาติคาสโซไซด์ต่อการหดตัวของลิ่มเลือด โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม 0.1% DMSO และกลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซด์ในความเข้มข้น 200 และ 400 μM พบว่ามีร้อยละของการหดตัว (% Clot retraction) เท่ากับ 26.93, 20.91 และ 4.53 ตามลำดับ และมีปริมาณของพลาสมาที่อยู่นอกลิ่มเลือดเท่ากับ 0.24 ± 0.03 ml, 0.19 ± 0.04 ml และ 0.055 ± 0.01 ml ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารมาติคาสโซไซด์สามารถลดการหดตัวของลิ่มเลือดได้ โดยกลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μM มีร้อยละของการหดตัวของลิ่มเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.001$) แสดงดังภาพ 19 และตาราง 2 ซึ่งบ่งชี้ว่าสารมาติคาสโซไซด์มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ clot retraction ที่เกิดจากการทำงานของเกล็ดเลือดได้

ตาราง 2 แสดงผลการหดตัวของลิ่มเลือดและปริมาณ plasma ในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO และกลุ่มที่ได้รับสารมาติคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 μ M และ 400 μ M

Test	Clotting area	% Clot retraction	Plasma volume (ml)	<i>p</i> -value*
DMSO	14,348 \pm 2,645.47	26.93	0.24 \pm 0.03	-
200 μ M MA	15,529.66 \pm 1,584.94	20.91	0.19 \pm 0.04	0.16
400 μ M MA	18,747.33 \pm 761.76	4.53	0.055 \pm 0.01	<0.001

* *p*-value เป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง MA และ Vehicle control

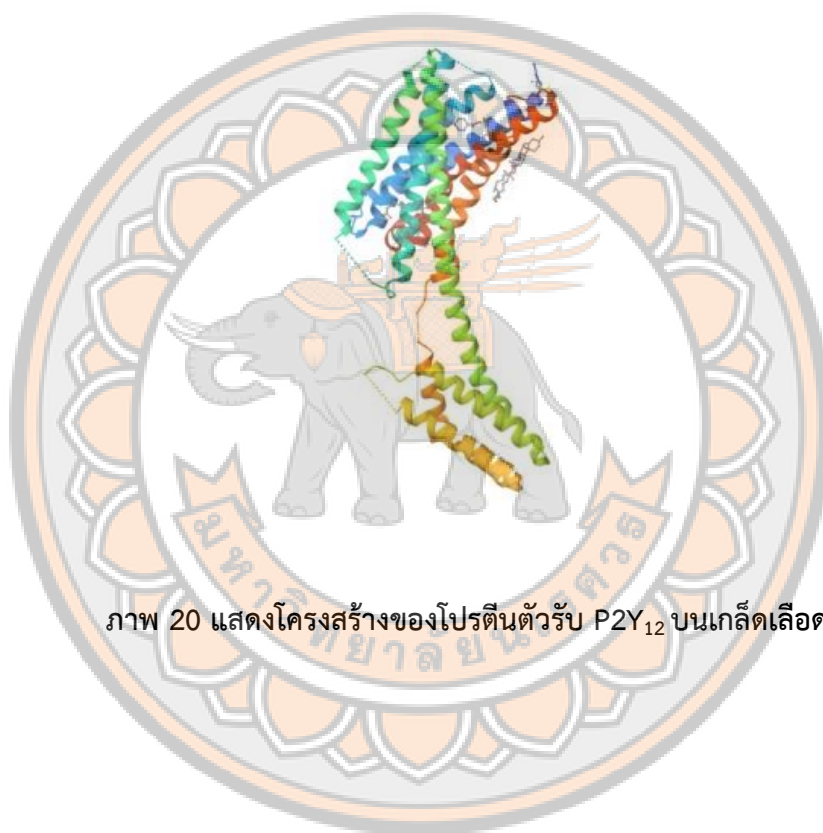


ภาพ 19 แสดงการเปรียบเทียบการหดตัวของก้อนไฟบรินในกลุ่มควบคุมที่ได้รับ DMSO และกลุ่มที่ได้รับ สารมาติคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 200 μ M และ 400 μ M

ผลการศึกษาโมเลกุลเป้าหมายของสารมาติคาสโซไซด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดีอกกิง

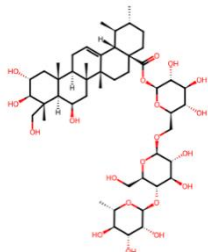
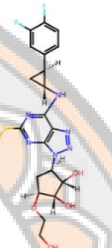
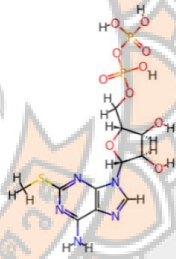
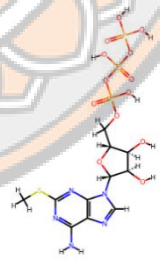
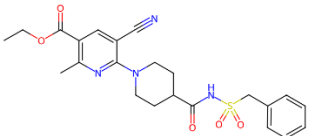
จากการศึกษาความสัมพันธ์การจับยี่ดระหว่างโปรตีนตัวรับกับลิแกนด์ โดยการศึกษาเลือกใช้โปรตีนจากฐานข้อมูล Protein Data Bank คือ โปรตีน P2Y₁₂ receptor รหัส 4PXZ, 4PY0 และ 4NTJ แสดงดังภาพ 20 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเกล็ดเลือด ในการเป็นตัวรับของ ADP สำหรับการจำลองการจับเชิงโมเลกุลกับลิแกนด์ โดยโปรตีนแต่ละรหัสมี active site ที่ inhibitor สามารถเข้ามาจับได้โปรตีนรหัส 4PXZ, 4PY0 และ 4NTJ มี 2MeSADP, 2MeSATP และ AZD1283 เป็น inhibitor ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการคัดเลือกยา ticagrelor ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม P2Y₁₂ inhibitors มาทำโมเลกุลาร์ดีอกกิง แสดงดังตาราง 3

ทำการทดสอบโมเลกุลเป้าหมายของสารมาติคาสโซไซด์ โดยใช้ SwissDock ซึ่งเป็น web-based tool เพื่อจำลองการจับกันของโปรตีนและลิแกนด์แบบ blind docking โดยผลลัพธ์ที่ได้จะเป็นค่าพลังงานอิสระกิบส์ (ΔG_b) ซึ่งค่า ΔG_b ที่มีค่าเป็นลบมาก จะบ่งบอกถึง binding affinity หรือความสามารถในการเข้าจับกันระหว่างสองโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม AutoDock Vina สำหรับการศึกษการจับกันแบบจำเพาะระหว่างโปรตีนที่สนใจกับลิแกนด์ ผลลัพธ์ที่ได้จะแสดงเป็นค่า binding affinity ที่เหมาะสมของแต่ละโมเลกุล



ภาพ 20 แสดงโครงสร้างของโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ บนเกล็ดเลือด

ตาราง 3 แสดงโครงสร้างของมาตีคาสโซไซด์และลิแกนด์ต่าง ๆ

ชื่อลิแกนด์	โครงสร้างโมเลกุล
Madecassoside	
ticagrelor	
2MeSADP (inhibitor ต่อโปรตีนรหัส 4PXZ)	
2MeSATP (inhibitor ต่อโปรตีนรหัส 4PY0)	
AZD1283 (inhibitor ต่อโปรตีนรหัส 4NTJ)	

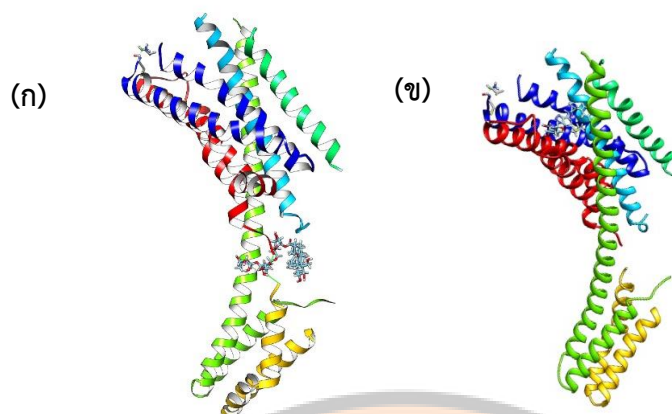
ผลการศึกษาพบว่า การทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสาร 2MeSADP, ticagrelor และสารมาตีคาสโซไซด์บนโปรตีน P2Y₁₂ รหัส 4PXZ มีค่า binding affinity เท่ากับ -12.65, -13.17 และ -7.37 kcal/mol ตามลำดับ การทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสาร 2MeSATP, ticagrelor และสารมาตีคาสโซไซด์บนโปรตีน P2Y₁₂ รหัส 4PY0 พบว่ามีค่า binding affinity เท่ากับ -12.00, -11.32

และ -8.12 kcal/mol ตามลำดับ และการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสาร AZD1283, ticagrelor และสารมาติคาสโซไซด์บนโปรตีน P2Y₁₂ รหัส 4NTJ พบว่ามีค่า binding affinity เท่ากับ -8.66, -10.72 และ -9.78 kcal/mol ตามลำดับ แสดงดังตาราง 4

เมื่อพิจารณาค่าพลังงานอิสระของกิบส์ พบว่าค่า binding affinity ของยา ticagrelor มีค่าใกล้เคียงกับค่า binding affinity ที่เกิดขึ้นระหว่าง inhibitors ได้แก่ 2MeSADP, 2MeSATP และ AZD1283 กับโปรตีนตัวรับ เมื่อเปรียบเทียบสารมาติคาสโซไซด์และยา ticagrelor บนโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ พบว่ามีค่า binding affinity ใกล้เคียงกัน บ่งชี้ว่า ticagrelor และสารมาติคาสโซไซด์สามารถเข้าจับกับบริเวณโปรตีนเป้าหมายได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่โปรตีน P2Y₁₂ รหัส 4NTJ แสดงดังภาพ 21

ตาราง 4 แสดงค่าพลังงานการยึดจับของโปรตีนตัวรับบนเกล็ดเลือดและตัวยับยั้งจาก SwissDock, MA = madecassoside

PDB code	Ligands	ค่า Binding affinity (ΔG); kcal/mol
4PXZ	2MeSADP	-12.65
	Ticagrelor	-13.17
	MA	-7.37
4PY0	2MeSATP	-12.00
	Ticagrelor	-11.32
	MA	-8.12
4NTJ	AZD1283	-8.66
	Ticagrelor	-10.72
	MA	-9.78



ภาพ 21 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ รหัส 4NTJ กับสารมาตีคาสโซไซด์ (ก) และ ticagrelor (ข)

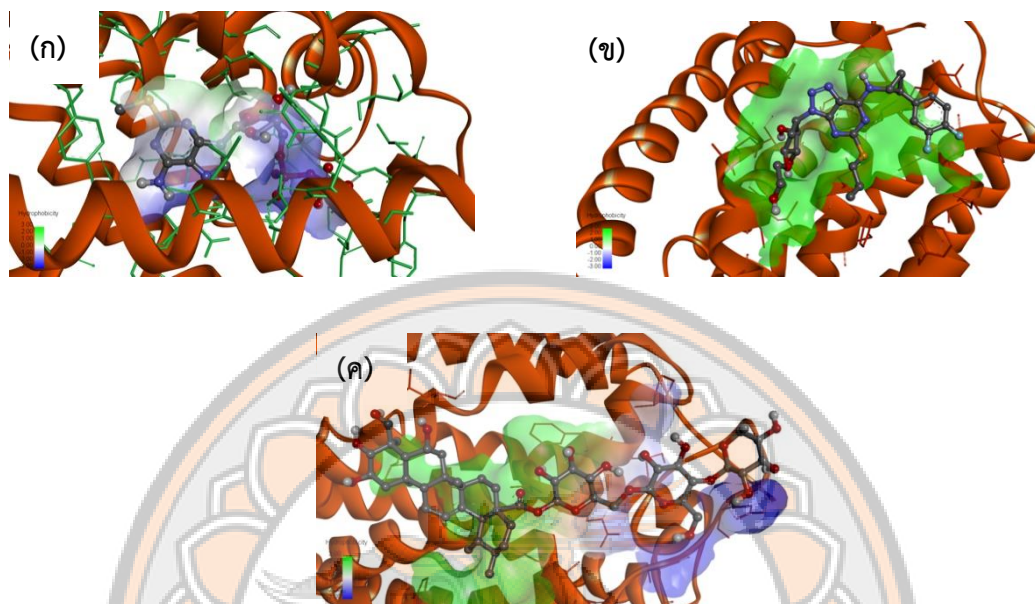
เมื่อทำโมเลกุลาร์ด็อกกิง โดยใช้โปรแกรม AutoDock Vina โดยกำหนดโปรโตคอลที่ใช้ในการระบุตำแหน่งและขนาดที่แน่นอนในการ docking เรียกว่ากริด (grid) โดยจะกำหนดขนาด Grid box เพื่อทำโมเลกุลาร์ด็อกกิง ผลลัพธ์ที่ได้จะแสดงเป็นค่า binding affinity ที่เหมาะสมของแต่ละโมเลกุล การกำหนดตำแหน่งของ Grid box ในงานวิจัยนี้ คือ center_x = 16.545, center_y = 100.106 และ center_z = 50.052 และกำหนดขนาดเท่ากับ 30x30x30 แสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 Grid box ที่ใช้สำหรับการทำ โมเลกุลาร์ด็อกกิง

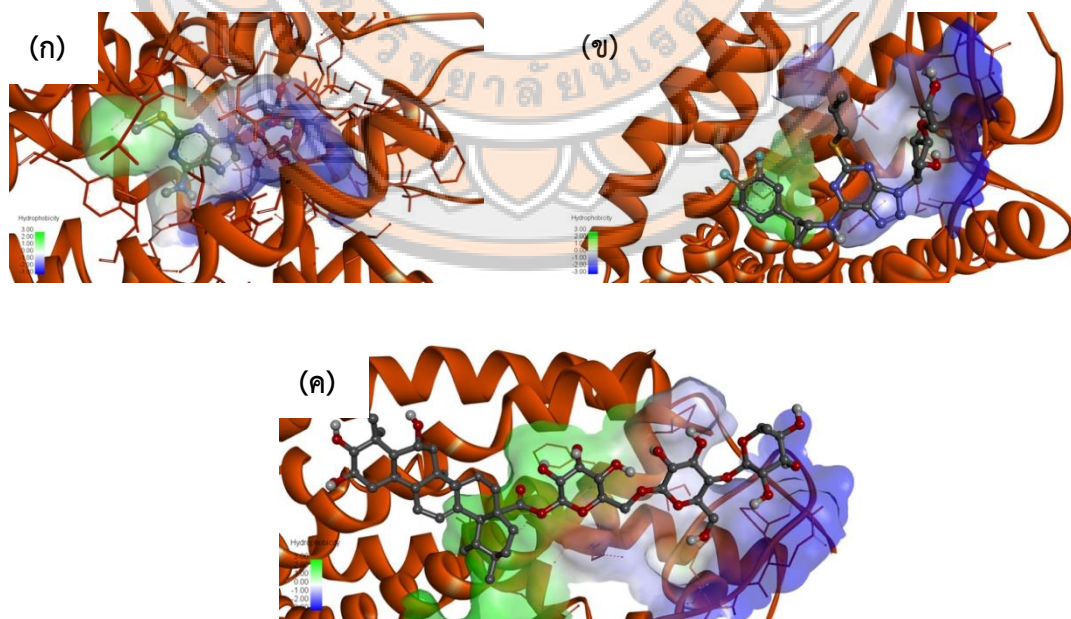
Protein	Center of grid	Box size
Human P2Y ₁₂ receptor	x = 16.545 y = 100.106 z = 50.052	30 x 30 x 30

การทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสาร 2MeSADP, ticagrelor และสารมาตีคาสโซไซด์บนโปรตีน P2Y₁₂ รหัส 4PXZ พบว่ามีค่า binding affinity เท่ากับ -15.1, -6.6 และ -4.9 kcal/mol ตามลำดับ การทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสาร 2MeSATP, ticagrelor และสารมาตีคาสโซไซด์บนโปรตีน P2Y₁₂ รหัส 4PY0 พบว่ามีค่า binding affinity เท่ากับ -15.7, -7.1 และ -6.8 kcal/mol ตามลำดับ และการทดสอบการเข้าจับกันระหว่างสาร AZD1283, ticagrelor และสารมาตีคาสโซไซด์

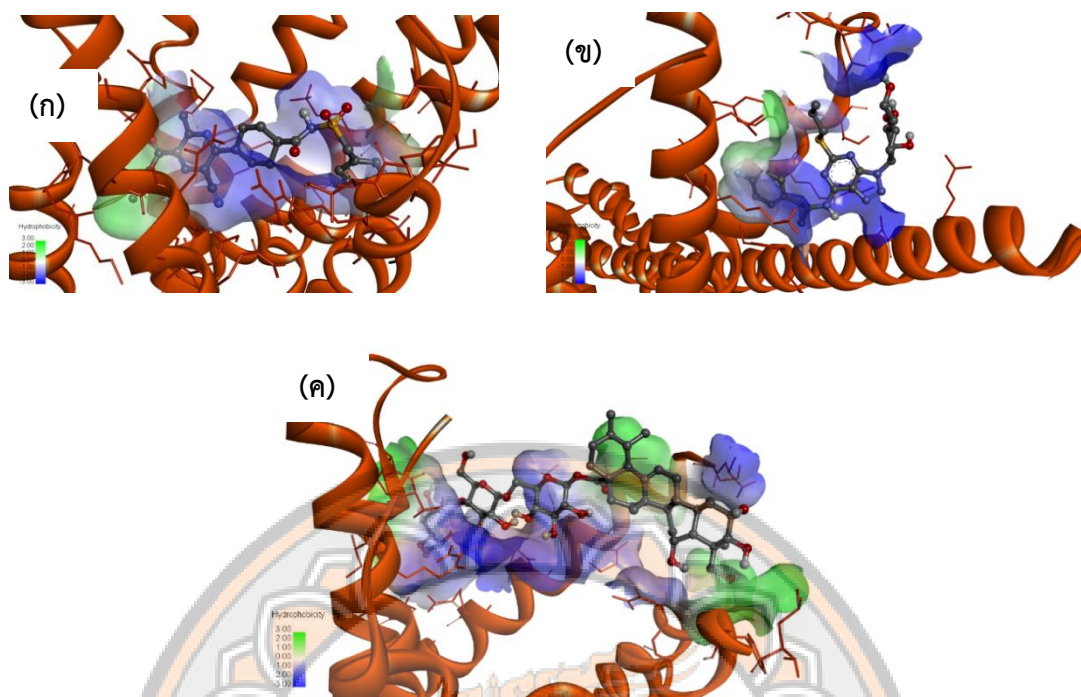
บนโปรตีน P2Y₁₂ รหัส 4NTJ พบว่ามีค่า binding affinity เท่ากับ -16.5, -9.4 และ -9.0 kcal/mol ตามลำดับ แสดงดังภาพ 22-24 และตาราง 6



ภาพ 22 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ รหัส 4PXZ กับ 2MeSADP (ก) ticagrelor (ข) และสารมาตีคาสโซไซต์ (ค)



ภาพ 23 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ รหัส 4PY0 กับ 2MeSATP (ก) ticagrelor (ข) และสารมาตีคาสโซไซต์ (ค)



ภาพ 24 แสดงการเข้าจับระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ รหัส 4NTJ กับ AZD1283 (ก) ticagrelor (ข) และสารมาดีคาสโซไซด์ (ค)

ตาราง 6 แสดงค่าพลังงานการยึดจับของโปรตีนตัวรับบนเกล็ดเลือดและตัวยับยั้งจากโปรแกรม AutoDock Vina, MA = madecassoside

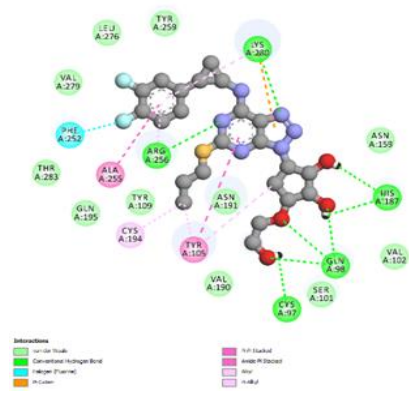
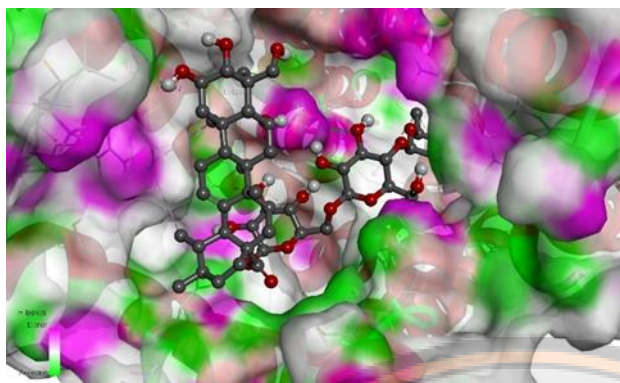
PDB code	Ligands	ค่า Binding affinity G;Kcal/mol
4 PXZ	2 MeSADP	-15.1
	ticagrelor	-6.6
	MA	-4.9
4PYO	2MeSATP	-15.7
	ticagrelor	-7.1
	MA	-6.8
4 NTJ	AZD 1283	-16.5
	ticagrelor	-9.4
	MA	-9.0

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ของสารมาตีคาสโซไซด์เทียบกับ ticagrelor บนโปรตีนรหัส 4NTJ พบว่ามี key residues ที่ตรงกัน คือ CYS97, GLN98, SER101, VAL102, TYR105, TYR109, ASN159, HIS187, VAL190, ASN191, CYS194, LEU276, LYS280 และมีค่า binding affinity ที่ใกล้เคียงกัน (-9.0 และ -9.4) แสดงดังภาพ 25-26 และตาราง 7

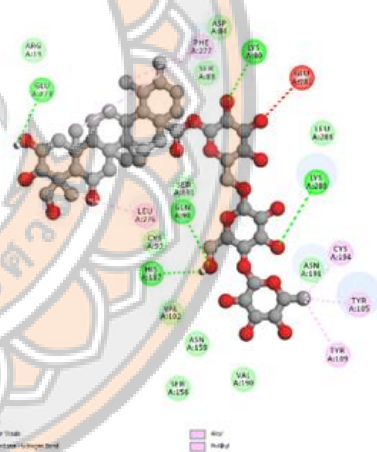
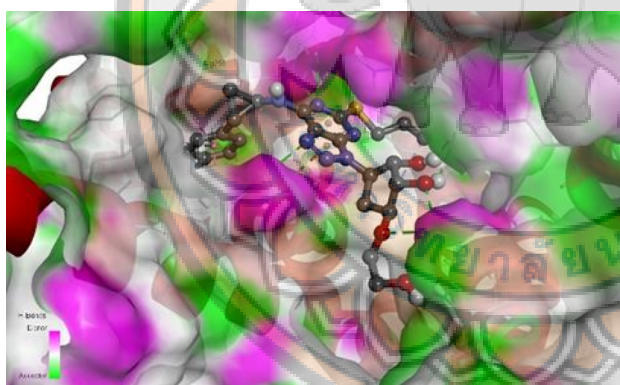
จึงสรุปได้เบื้องต้นว่าสารมาตีคาสโซไซด์อาจเป็นสารในกลุ่ม P2Y₁₂ inhibitors เนื่องจากมีความสามารถในการเข้าจับกับโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ ได้เช่นเดียวกับ AZD1283 และ ticagrelor ซึ่งเป็น P2Y₁₂ inhibitors

ตาราง 7 แสดงโมเลกุลาร์ด็อกกิง binding energy ของโปรตีน P2Y₁₂ กับ ลิแกนด์ต่าง ๆ

Target protein	Chemical	Estimate ΔG (kcal/mol)	Number of H bond	Amino acid interaction
Human P2Y ₁₂ receptor	AZD1283 (inhibitor)	-16.5	3	VAL102, TYR 105, PHE106, TYR109, LEU155, SER156, ASN159, HIS187, VAL190, ASN191, CYS194, GLN195, PHE252, ALA255, ARG256, TYR259, LEU276, VAL279, LYS280, THR283
	ticagrelor	-9.4	7	CYS97, GLN98, SER101, VAL102, TYR105, TYR109, ASN159, HIS187, VAL190, ASN191, CYS194, GLN195, PHE252, ALA255, ARG256, TYR259, LEU276, VAL279, LYS280, THR283
	Madecassoside	-9.0	5	ARG19, LYS80, SER83, ASP84, CYS97, GLN98, SER101, VAL102, TYR105, TYR 109, SER156, ASN159, HIS187, VAL190, ASN191, CYS194, GLU273, LEU276, PHE277, LYS280, GLU281, LEU284



ภาพ 25 แสดงอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน P2Y₁₂ กับสารมาติคาสโซไซด์
ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง



ภาพ 26 แสดงอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน P2Y₁₂ กับ ticagrelor ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ด็อกกิง

บทที่ 5

บทสรุป

อภิปรายผล

จากการทดสอบการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยใช้ 5 μM ADP เป็นสารกระตุ้นพบว่าสารมาติคาสโซไซด์ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 400 μM ซึ่งสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ ร้อยละ 36.75 และเป็นความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.005$) ในขณะที่ความเข้มข้น 200 μM ยับยั้งได้ ร้อยละ 26.17 ซึ่งผลลัพธ์ดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงแนวโน้มของฤทธิ์ dose-dependent effect ที่ความเข้มข้นสูงให้ผลยับยั้งที่เด่นชัดกว่า และบ่งชี้ว่าสารมาติคาสโซไซด์มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย ADP เมื่อพิจารณากลไกระดับโมเลกุล พบว่าการตอบสนองต่อ ADP จะเกิดขึ้นผ่านตัวรับชนิด P2Y₁₂ ซึ่งส่งสัญญาณผ่านโปรตีน Gi ทำให้ระดับ cAMP ลดลง และลดการทำงานของ Protein Kinase A (PKA) ส่งผลให้เกล็ดเลือดตอบสนองต่อการกระตุ้นได้มากขึ้น พร้อมทั้งเพิ่มการทำงานของ PI3K ที่นำไปสู่การสร้าง PIP3 และการกระตุ้น Akt ซึ่งมีบทบาทในการเปลี่ยนรูปร่าง การหลั่งสารกระตุ้น และทำให้เกิดการทำงานของ GPIIb/IIIa integrin ดังนั้น การที่สารมาติคาสโซไซด์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ อาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการรบกวนเส้นทางดังกล่าว โดยอาจลดสัญญาณผ่าน P2Y₁₂-PI3K-Akt หรือเสริมการคงอยู่ของสัญญาณ cAMP-PKA ทำให้การตอบสนองต่อ ADP ลดลง จึงทำให้การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดลดลง สอดคล้องกับการศึกษาผลของสารสกัดจากธรรมชาติชนิดไตรเทอร์พีนอยด์ ในปี 2020 Ampofo และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ของ Frondoside A (triterpenoid จาก sea cucumber) ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* เพื่อประเมินศักยภาพเป็นสารต้านการเกิดลิ่มเลือด พบว่า Frondoside A ทำหน้าที่เป็นสารต้านการทำงานของเกล็ดเลือด โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดและขัดขวาง signaling (PI3K→Akt/ERK) ที่จำเป็นต่อการเกาะกลุ่มและการเกิดก้อนลิ่มเลือด (Ampofo et al., 2020) นอกจากนี้ Lou และคณะ ได้ศึกษารากของสมุนไพร Platycodon grandiflorum (รากโป๊ยก็กจิน) พบว่า Platycodin D ซึ่งเป็นสารซาโปนินไตรเทอร์พีนอยด์ สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มและการกระตุ้นของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นหลายชนิด เช่น collagen, ADP, AA ได้เช่นกัน (Luo et al., 2018) ดังนั้นจึงคาดว่าสารมาติคาสโซไซด์ ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ด

เลือดผ่านการยับยั้งสัญญาณภายในเกล็ดเลือดเช่นเดียวกันกับที่ได้มีการศึกษามาแล้วก่อนหน้านี้ ทั้งนี้ควรยืนยันระดับการส่งสัญญาณต่างๆภายในเกล็ดเลือดด้วยเทคนิค Western blot ต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ของสารมาตีคาสโซไซต์ต่อการเกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen แสดงให้เห็นว่าสารมาตีคาสโซไซต์ที่ความเข้มข้น 400 μM ลดจำนวนเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการทดสอบพบว่าสารมาตีคาสโซไซต์มีผลต่อการแผ่ขยายของเกล็ดเลือดอย่างชัดเจนรวมถึงมีการแสดงให้เห็นว่าสารมาตีคาสโซไซต์มีผลต่อการจัดเรียงโครงสร้าง cytoskeleton ของเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้น ผลดังกล่าวแสดงว่าสารมาตีคาสโซไซต์สามารถยับยั้งการเกาะติดของเกล็ดเลือดโดยตรง และสามารถยับยั้งการแผ่ขยายและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเกล็ดเลือดได้ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในขั้นตอนการกระตุ้นเกล็ดเลือด โดยงานวิจัยของ Nigam และคณะ แสดงให้เห็นว่า GPIIb/IIIa มีการสื่อสารในรูปแบบ outside-in signaling หลังจากที่มีการจับกับ fibrinogen เพื่อควบคุมการแผ่ขยายและการหดตัวของเกล็ดเลือด โดยมีบทบาทสำคัญของ PI3K, PLC, PKC (Platelet spreading & clot retraction) (Nigam, Manjuprasanna, Naik, & Naik, 2025) นอกจากนี้ การจัดเรียง F-actin ในเกล็ดเลือดที่มีการแผ่ขยายบน fibrinogen ถูกควบคุมโดย GPIIb/IIIa สารมาตีคาสโซไซต์อาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง actin ทำให้การจัดเรียงของ F-actin ลดลง และยับยั้งการเปลี่ยนรูปร่างของเกล็ดเลือดให้เป็น filopodia ได้

จากการศึกษาการเข้าจับของสารมาตีคาสโซไซต์ด้วยวิธีโมเลกุลาร์ต็อกกิงเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานในกลุ่ม P2Y₁₂ inhibitors ได้แก่ 2MeSADP, 2MeSATP, AZD1283 และยา ticagrelor ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเกล็ดเลือดผ่านการยับยั้งตัวรับชนิด P2Y₁₂ จากผลการจำลองการจับเชิงโมเลกุล พบว่าสารมาตีคาสโซไซต์มีค่า binding affinity ใกล้เคียงกับยา ticagrelor โดยเฉพาะบนโปรตีนรหัส 4NTJ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ซับซ้อนและมี inhibitor ที่ทราบตำแหน่งการจับชัดเจน การที่สารมาตีคาสโซไซต์สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและแรงยึดเหนี่ยวอื่น ๆ ในบริเวณเดียวกันกับ key residues ของสารยับยั้ง P2Y₁₂ inhibitors ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่สารนี้อาจมีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดผ่านกลไก P2Y₁₂ receptor pathway ได้เช่นเดียวกับ ticagrelor อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมาตีคาสโซไซต์เป็นสารไกลโคไซด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และมีหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก การเข้าจับจึงอาจถูกจำกัดด้วยขนาดและความยืดหยุ่นของโมเลกุล ซึ่งอาจส่งผลต่อความเสถียรของการจับเมื่อเทียบกับสารสังเคราะห์ขนาดเล็กอย่าง ticagrelor ดังนั้น การจำลองการจับเชิงโมเลกุลในครั้งนี้สนับสนุนแนวคิดที่ว่า สารมาตีคาสโซไซต์อาจเป็นสารจากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาต้านเกล็ดเลือดชนิดใหม่ในอนาคต จากการศึกษาการคัดกรองเชิงโครงสร้าง (homology/docking) ของ Zhang และคณะ ได้ค้นหาและระบุโครงสร้างผลึกของ P2Y₁₂ ขณะจับ agonist สองชนิด คือ 2MeSADP analogue ของ ADP และ 2MeSATP ATP derivative ที่อาจทำงานเป็น partial-agonist สิ่งที่ค้นพบ คือ โครงสร้างกลไกการจับ pocket และตำแหน่งการจับลิ

แกนดของ 2MeSADP จับใน pocket ภายใน transmembrane domain ของ P2Y₁₂ โดยมีการเชื่อมโยงผ่าน hydrogen bonds, salt bridges และ π - π interaction กับ key residues รวมถึง interaction ที่ไม่เคยถูกระบุมาก่อนว่าเกี่ยวข้องกับ agonist binding เมื่อนำโครงสร้าง agonist-bound มาเปรียบเทียบกับโครงสร้างที่จับ antagonist พบว่า agonist binding ทำให้เกิด rearrangement ครั้งใหญ่ใน extracellular region ของ receptor การเคลื่อนไหวส่วนของ helices (helix VI & VII) โดยเฉพาะการย้ายด้าน extracellular ของ helices เหล่านั้นไปยังกลาง transmembrane domain อีกทั้งยังพบข้อจำกัด คือ ลิแกนด์ที่อยู่ในโครงสร้างเป็น nucleotide analogues (2MeSADP, 2MeSATP) ซึ่งมีความแตกต่างทางเคมีเมื่อเทียบกับไตรเทอร์พีนอยด์จากธรรมชาติ ดังนั้นการออกแบบลิแกนด์ ต้องระวังเรื่องความเหมาะสมของ pocket ทางด้าน size, polarity, H-bond, ionic interactions อีกทั้งควรใช้เทคนิค Molecular Dynamics Simulation (MD Simulation) เป็นเครื่องมือทางคอมพิวเตอร์ที่ใช้ศึกษาการเคลื่อนไหวของอะตอมและโมเลกุลในช่วงเวลาจำลอง โดยอาศัยหลักการของกลศาสตร์คลาสสิก เพื่อคำนวณแรง และพลังงานศักย์ระหว่างอะตอมแต่ละตัวในระบบ ซึ่งช่วยให้นักวิจัยสามารถเข้าใจพฤติกรรมเชิงพลวัตของโปรตีนและโมเลกุลที่จับกับโปรตีนนั้นได้อย่างละเอียด นำมาประเมินเสถียรภาพของการจับระหว่างสารมาตีคาสโซไซด์กับ P2Y₁₂ receptor ในช่วงเวลาจำลอง อีกทั้งควรศึกษาเพื่อวิเคราะห์ค่า Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity (ADMET) เพื่อประเมินว่าสารมาตีคาสโซไซด์มีความเหมาะสมที่จะเป็นยาใหม่สำหรับรักษาผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมองในอนาคตต่อไป

สรุปผลการศึกษา

การวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ของสารมาตีคาสโซไซด์ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดและการศึกษาโมเลกุลเป้าหมายด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดอกกิง พบว่าสารมาตีคาสโซไซด์ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเกล็ดเลือด และที่ความเข้มข้น 200 และ 400 μ M สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ได้ โดยฤทธิ์ยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสาร นอกจากนี้สารมาตีคาสโซไซด์ที่ความเข้มข้น 400 μ M ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะติด การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การแผ่ขยาย และการจัดเรียงโครงสร้าง cytoskeleton ของเกล็ดเลือดที่เกาะติดบนพื้นผิว fibrinogen รวมถึงสามารถยับยั้งการหดตัวของลิ่มเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในการวิเคราะห์การจับกันระหว่างโปรตีนและลิแกนด์ด้วยเทคนิคโมเลกุลาร์ดอกกิง พบว่าค่าพลังงานการยึดจับ (ΔG) ระหว่างโปรตีนตัวรับ P2Y₁₂ กับสารมาตีคาสโซไซด์มีค่าใกล้เคียงกับยา ticagrelor บ่งชี้ว่าสารมาตีคาสโซไซด์อาจออกฤทธิ์ผ่านกลไกคล้ายกับยา ticagrelor ที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน P2Y₁₂ ได้โดยตรง



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- Alburyhi, M. M., Saif, A. A., & Noman, M. A. (2024). Ticagrelor-Excipient Compatibility Studies for Advanced Drug delivery Systems Development. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(10), 1081-1132.
- Ampofo, E., Später, T., Nalbach, L., Menger, M. D., & Laschke, M. W. (2020). The marine-derived triterpenoid frondoside A inhibits thrombus formation. *Marine Drugs*, 18(2), 111.
- Aslan, J. E. (2017). Platelet shape change. *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Pathophysiology, pharmacology and therapeutics: An update*, 321-336.
- Assinger, A., Volf, I., & Schmid, D. (2015). A novel, rapid method to quantify intraplatelet calcium dynamics by ratiometric flow cytometry. *PLoS One*, 10(4), e0122527.
- Bevers, E., Comfurius, P., & Zwaal, R. (1991). Platelet procoagulant activity: physiological significance and mechanisms of exposure. *Blood reviews*, 5(3), 146-154.
- Birukova, A. A., Zagranichnaya, T., Fu, P., Alekseeva, E., Chen, W., Jacobson, J. R., & Birukov, K. G. (2007). Prostaglandins PGE2 and PGI2 promote endothelial barrier enhancement via PKA-and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Experimental cell research*, 313(11), 2504-2520.
- Born, G. V. R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 194(4832), 927-929.
- Cattaneo, M. (2009). *Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function*. Paper presented at the Seminars in thrombosis and hemostasis.
- Cazenave, J.-P., Ohlmann, P., Cassel, D., Eckly, A., Hechler, B., & Gachet, C. (2004). Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. In *Platelets and Megakaryocytes: Volume 1: Functional Assays* (pp. 13-28): Springer.

- Chen, H., Zhang, S., Wang, H., Bao, L., Wu, W., & Qi, R. (2022). Fruitflow inhibits platelet function by suppressing Akt/GSK3 β , Syk/PLC γ 2 and p38 MAPK phosphorylation in collagen-stimulated platelets. *BMC complementary medicine and therapies*, 22(1), 75.
- Cheng, Y., Austin, S. C., Rocca, B., Koller, B. H., Coffman, T. M., Grosser, T., . . . FitzGerald, G. A. (2002). Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science*, 296(5567), 539-541.
- Cosemans, J. M., Angelillo-Scherrer, A., Mattheij, N. J., & Heemskerk, J. W. (2013). The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization. *Cardiovascular research*, 99(2), 342-352.
- Crescente, M., Menke, L., Chan, M. V., Armstrong, P. C., & Warner, T. D. (2019). Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). *British journal of pharmacology*, 176(8), 988-999.
- Cuenca-Zamora, E. J., Ferrer-Marín, F., Rivera, J., & Teruel-Montoya, R. (2019). Tubulin in platelets: when the shape matters. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3484.
- D'souza, S., Ginsberg, M. H., Burke, T. A., & Plow, E. F. (1990). The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3440-3446.
- Dorsam, R. T., & Kunapuli, S. P. (2004). Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *The Journal of clinical investigation*, 113(3), 340-345.
- Durrant, T. N., van den Bosch, M. T., & Hers, I. (2017). Integrin α IIb β 3 outside-in signaling. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 130(14), 1607-1619.
- Entsie, P., Kang, Y., Amofo, E. B., Schöneberg, T., & Liverani, E. (2023). The signaling pathway of the ADP receptor P2Y₁₂ in the immune system: Recent discoveries and new challenges. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6709.

- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7, 83-89.
- Fan, J., & Watanabe, T. (2003). Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 10(2), 63-71.
- Ferri, N., Colombo, E., Tenconi, M., Baldessin, L., & Corsini, A. (2022). Drug-drug interactions of direct oral anticoagulants (DOACs): from pharmacological to clinical practice. *Pharmaceutics*, 14(6), 1120.
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols*, 11(5), 905-919.
- Gachet, C. (2001). P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*, 86, 222-232.
- Hardy, A. R., Jones, M. L., Mundell, S. J., & Poole, A. W. (2004). Reciprocal cross-talk between P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood*, 104(6), 1745-1752.
- Heemskerk, J. W., Bevers, E. M., & Lindhout, T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thrombosis and haemostasis*, 88(08), 186-193.
- Hirsh, J., Bauer, K. A., Donati, M. B., Gould, M., Samama, M. M., & Weitz, J. I. (2008). Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 133(6), 141S-159S.
- Huang, E. S., Strate, L. L., Ho, W. W., Lee, S. S., & Chan, A. T. (2011). Long-term use of aspirin and the risk of gastrointestinal bleeding. *The American journal of medicine*, 124(5), 426-433.
- Huang, H.-C., Tsai, W.-J., Liaw, C.-C., Wu, S.-H., Wu, Y.-C., & Kuo, Y.-H. (2007). Anti-platelet aggregation triterpene saponins from the galls of *Sapindus mukorossi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(9), 1412-1415.
- Insull Jr, W. (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine*, 122(1), S3-S14.
- Jávega, B., Herrera, G., Martínez-Romero, A., & O'Connor, J.-E. (2023). Flow cytometry of oxygen and oxygen-related cellular stress. *Oxygen*, 3(2), 222-255.

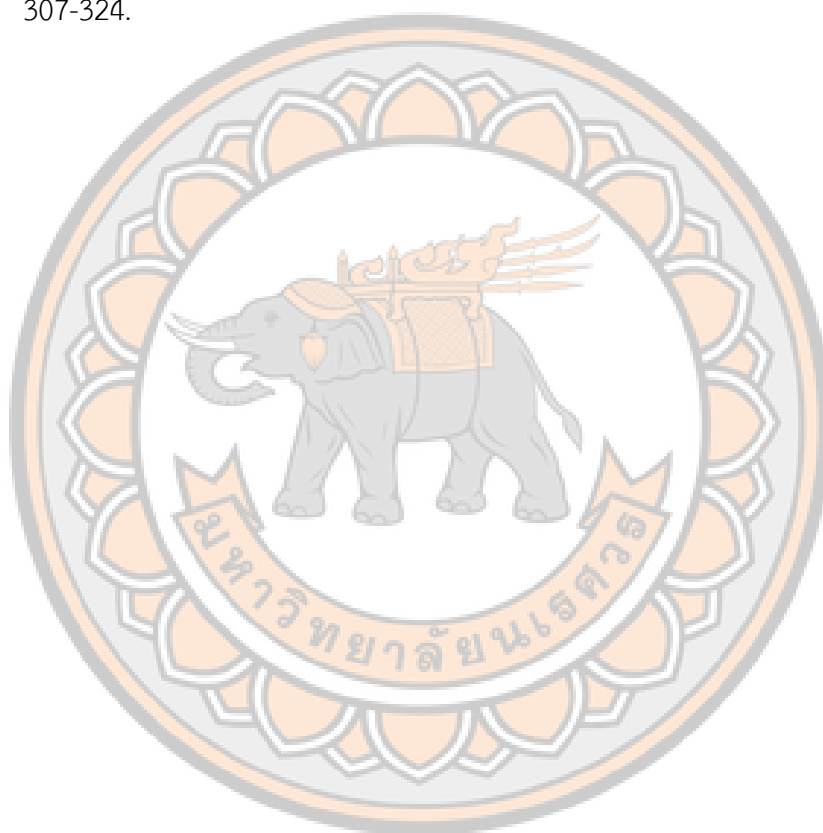
- Jin, J. L., Lee, Y. Y., Heo, J. E., Lee, S., Kim, J. M., & Yun-Choi, H. S. (2004). Anti-platelet pentacyclic triterpenoids from leaves of *Campsis grandiflora*. *Archives of pharmacal Research*, *27*, 376-380.
- Kahn, M. L., Zheng, Y.-W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., . . . Coughlin, S. R. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, *394*(6694), 690-694.
- Kaiser, R., Dewender, R., Mulkers, M., Stermann, J., Rossaro, D., Di Fina, L., . . . Kääh, L. (2024). Procoagulant platelet activation promotes venous thrombosis. *Blood*, *144*(24), 2546-2553.
- Kraikate, T., Maksub, S., & Nilsri, N. (2015). Effect of madecassoside combined with aspirin on platelet functions. *Bulletin of Chiang Mai Associated Medical Sciences*, *48*(3), 214.
- Kunjumon, R., Viswanathan, G., Jayasree, D., Biju, P., Prakash, P., Sasidharan, B., & Baby, S. (2020). Madecassoside encapsulated in alginate chitosan nanoparticles exerts anti-excitotoxicity effects in pilocarpine-induced seizure. doi:10.1016/j.phyflu.2020.100004
- Lalun, A., & Vutiso, P. (2021). Factors predicting stroke preventive behaviors of hypertensive patients at Na Fai Sub-District Health Promoting Hospital in Chang Wat Chaiyaphum. *Thai Journal of Nursing*, *70*(2), 27-36.
- Li, M., Liu, F., Jin, Y.-R., Wang, X.-Z., Wu, Q., Liu, Y., & Li, X.-W. (2017). Five new triterpenoid saponins from the rhizomes of *Panacis majoris* and their antiplatelet aggregation activity. *Planta medica*, *83*(03/04), 351-357.
- Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A., & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *30*(12), 2341-2349.
- Lopes, R. D., Heizer, G., Aronson, R., Vora, A. N., Massaro, T., Mehran, R., . . . Li, J. (2019). Antithrombotic therapy after acute coronary syndrome or PCI in atrial fibrillation. *New England Journal of Medicine*, *380*(16), 1509-1524.

- Lordkipanidzé, M., Pharand, C., Schampaert, E., Turgeon, J., Palisaitis, D. A., & Diodati, J. G. (2007). A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *European heart journal*, *28*(14), 1702-1708.
- Luo, Q., Wei, G., Wu, X., Tang, K., Xu, M., Wu, Y., . . . Ju, W. (2018). Platycodin D inhibits platelet function and thrombus formation through inducing internalization of platelet glycoprotein receptors. *Journal of translational medicine*, *16*(1), 311.
- Marler, J. R., Tilley, B., Lu, M., Brott, T. G., Lyden, P., Grotta, J., . . . Horowitz, S. (2000). Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study. *Neurology*, *55*(11), 1649-1655.
- McCarthy, M. W., & Kockler, D. R. (2003). Clopidogrel-associated leukopenia. *Annals of Pharmacotherapy*, *37*(2), 216-219.
- Michelson, A. D. (2009). Methods for the measurement of platelet function. *The American journal of cardiology*, *103*(3), 20A-26A.
- Montague, S. J., Lim, Y. J., Lee, W. M., & Gardiner, E. E. (2020). Imaging Platelet Processes and Function—Current and Emerging Approaches for Imaging in vitro and in vivo. *Frontiers in immunology*, *11*, 78.
- Moore, R. D., Mumaw, V. R., & Schoenberg, M. D. (1964). The structure of the spleen and its functional implications. *Experimental and Molecular Pathology*, *3*(1), 31-50.
- Moroi, A., & Watson, S. (2015). Akt and mitogen-activated protein kinase enhance C-type lectin-like receptor 2-mediated platelet activation by inhibition of glycogen synthase kinase $3\alpha/\beta$. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *13*(6), 1139-1150.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, *30*(16), 2785-2791.

- Nakamura, T., Kambayashi, J.-i., Okuma, M., & Tandon, N. N. (1999). Activation of the GP IIb-IIIa complex induced by platelet adhesion to collagen is mediated by both $\alpha 2\beta 1$ integrin and GP VI. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11897-11903.
- Nigam, A., Manjuprasanna, V. N., Naik, M. U., & Naik, U. P. (2025). Platelet spreading and clot retraction are regulated by 2 distinct $\alpha \text{IIb}\beta 3$ outside-in signaling pathways. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 392(1), 100012.
- Ogita, H., & Liao, J. K. (2004). Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*, 11(2), 123-132.
- Olas, B., Urbańska, K., & Bryś, M. (2020). Saponins as modulators of the blood coagulation system and perspectives regarding their use in the prevention of venous thromboembolic incidents. *Molecules*, 25(21), 5171.
- Oluwagbemiga, O. F. (2015). *Anti-platelet aggregation activity of melaleuca bracteata var. revolution gold derived betulinic acid and its derivatives*.
- Oury, C., Toth-Zsomboki, E., Vermylen, J., & Hoylaerts, M. F. (2006). The platelet ATP and ADP receptors. *Current pharmaceutical design*, 12(7), 859-875.
- Park, K., Mao, F., & Park, H. (1990). Morphological characterization of surface-induced platelet activation. *Biomaterials*, 11(1), 24-31.
- Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., . . . Hoh, B. (2019). Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 50(12), e344-e418.
- Previtali, E., Bucciarelli, P., Passamonti, S. M., & Martinelli, I. (2011). Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood transfusion*, 9(2), 120.
- Raval, J., Gongadze, E., Benčina, M., Junkar, I., Rawat, N., Mesarec, L., . . . Igljč, A. (2021). Mechanical and electrical interaction of biological membranes with nanoparticles and nanostructured surfaces. *Membranes*, 11(7), 533.

- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 671-675.
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*: John Wiley & Sons.
- Shattil, S. J., Hoxie, J. A., Cunningham, M., & Brass, L. F. (1985). Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(20), 11107-11114.
- Singh, S. K., Suresh, M. V., Voleti, B., & Agrawal, A. (2008). The connection between C-reactive protein and atherosclerosis. *Ann Med*, *40*(2), 110-120. doi:10.1080/07853890701749225
- Stinear, C. M., Lang, C. E., Zeiler, S., & Byblow, W. D. (2020). Advances and challenges in stroke rehabilitation. *The Lancet Neurology*, *19*(4), 348-360.
- Storey, R. F., Angiolillo, D. J., Patil, S. B., Desai, B., Ecob, R., Husted, S., . . . Wallentin, L. (2010). Inhibitory effects of ticagrelor compared with clopidogrel on platelet function in patients with acute coronary syndromes: the PLATO (PLATElet inhibition and patient Outcomes) PLATELET substudy. *Journal of the American College of Cardiology*, *56*(18), 1456-1462.
- Szczuko, M., Koziół, I., Kotłowska, D., Brodowski, J., & Drozd, A. (2021). The role of thromboxane in the course and treatment of ischemic stroke. *International journal of molecular sciences*, *22*(21), 11644.
- Theofilis, P., Sagris, M., Oikonomou, E., Antonopoulos, A. S., Tsioufis, K., & Tousoulis, D. (2022). Factors associated with platelet activation-recent pharmaceutical approaches. *International journal of molecular sciences*, *23*(6), 3301.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, *31*(2), 455-461.
- Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods in cell biology*, *30*, 127-156.
- Vane, J., & Botting, R. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis research*, *110*(5-6), 255-258.

- Vu, T.-K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64(6), 1057-1068.
- Woulfe, D. S. (2010). Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert review of hematology*, 3(1), 81-91.
- Zhang, Y., Zhang, S., & Ding, Z. (2016). Role of P2Y₁₂ receptor in thrombosis. *Thrombosis and embolism: from research to clinical practice: volume 1*, 307-324.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก รายการเครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ก.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Instruments and Equipment)

- เครื่องตรวจวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Automated hematology analyzer; Sysmex XN-1000)
- เครื่องวิเคราะห์เคมีคลินิกอัตโนมัติ (Clinical chemistry analyzer; Cobas C311)
- เครื่องวิเคราะห์การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Platelet aggregometer; APACT)
- กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล (Confocal laser scanning microscope; Leica TCS SP8)

ก.2 สารเคมีและสารละลาย (Chemicals and Reagents)

- 3.2% Sodium citrate
- Tyrode's albumin buffer
- Heparin ความเข้มข้น 10 U/mL
- Prostaglandin I₂ (PGI₂) ความเข้มข้น 0.5 μM
- Apyrase ความเข้มข้น 0.02 U/mL
- Madecassoside
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 0.1%
- Triton X-100 ความเข้มข้น 0.1%
- Adenosine diphosphate (ADP) ความเข้มข้น 5 μM
- Collagen ความเข้มข้น 2.5 μg/mL
- Paraformaldehyde
- Fibrinogen
- Anti- α -Tubulin conjugated with Alexa Fluor 488 (Anti-TUBULIN-488)
- Anti-Myosin conjugated with Alexa Fluor 647 (Anti-MYOSIN-647)
- Phalloidin conjugated with Alexa Fluor 555 (PHALLOIDIN-555)
- Calcium chloride (CaCl₂) ความเข้มข้น 0.025 mol/L