

เกล็ดเลือดทำให้ภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดเพิ่มสูงขึ้น ในผู้ป่วยโควิด 19

บทคัดย่อ (Abstract)

หลังจากที่มีหลักฐานเกี่ยวกับฟิโนไทป์ของเกล็ดเลือดชนิด hyperactive ในผู้ที่ติดเชื้อโควิด 19 เราจึงได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติของ effector cell ในเกล็ดเลือดของผู้ที่ติดเชื้อโควิด 19 ที่มีผลต่อเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด (endothelial cells - ECs) จากการบูรณาการการทำ sequencing สำหรับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดและอาร์เอ็นเอของเกล็ดเลือด (platelet RNA) เผยให้เห็นว่า factors ต่าง ๆ ที่เกล็ดเลือดปลดปล่อยในผู้ที่ติดเชื้อโควิด 19 สนับสนุนให้เกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดที่มีการอักเสบและเกิดลิ่มเลือดได้ง่ายกว่าปกติ (inflammatory hypercoagulable endotheliopathy) เราได้ระบุชี้ว่า *S100A8* และ *S100A9* เป็น transcripts ที่อุดมไปด้วยเกล็ดเลือดที่ติดเชื้อโควิด 19 และได้รับการกระตุ้นจาก megakaryocyte ในผู้ที่ติดเชื้อ SARS-CoV-2 และสอดคล้องตรงกันกับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น myeloid-related protein 8 (MRP8)/MRP14 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ heterodimer protein ของยีน *S100A8/A9* ก็มีการปลดปล่อยออกมาในปริมาณมากมายจากเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (controls) เราได้แสดงให้เห็นว่า MRP8/14 จากเกล็ดเลือดเป็นตัวกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด สนับสนุนให้เกิดฟิโนไทป์ที่ทำให้เกิดการอักเสบและภาวะการเกิดลิ่มเลือดอุดตันได้ง่ายกว่าปกติ (inflammatory hypercoagulable phenotype) รวมทั้งเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดผลทางคลินิกที่ไม่ดีในผู้ป่วยโควิด 19 ท้ายสุดเราได้นำเสนอหลักฐานว่าการพุ่งเป้าไปที่ platelet P2Y₁₂ เป็นการหมายถึงว่ามีความหวังในการลดปฏิกริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเยื่อผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory platelet-endothelial interactions) เมื่อรวมเข้ากันแล้วสิ่งที่ค้นพบเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของเกล็ดเลือดและภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่ได้รับการกระตุ้นจากเกล็ดเลือดซึ่งก่อนหน้านี้ไม่ได้รับความชื่นชมในผู้ป่วยโควิด 19

บทนำ (INTRODUCTION)

โรคโคโรนาไวรัส 2019 (โควิด 19) เป็นโรคเฉียบพลันจากเชื้อไวรัสซึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงหรือซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มีภาวะอักเสบทั้งระบบอย่างรุนแรง (**intense systemic inflammation**) และภาวะที่ลิ่มเลือดอุดตันหลอดเลือดได้ง่ายกว่าปกติ (**hypercoagulability**) เป็นจุดเด่นในผู้ป่วยรายที่รุนแรง (**1, 2**) มีการพบการเกิดลิ่มเลือดของหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำในอัตราที่สูงอยู่บ่อยครั้งในการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 (**3-5**) สาเหตุของความคิดปกติในการแข็งตัวของเลือด (**coagulopathy**) ซึ่งสัมพันธ์กับโควิด 19 ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันและมีความเป็นไปได้ว่ามีความสลับซับซ้อน โดยที่มีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากบรรดาสารที่เป็นสื่อกลาง (**mediators**) มากมาย ทั้งชนิด **cellular** และชนิด **noncellular**

เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (**vascular endothelium**) ทำหน้าที่เป็นส่วนต่อประสาน (**interface**) ที่สำคัญระหว่างเลือดกับเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย หลอดเลือดที่บุด้วยผนังเยื่อหลอดเลือดชั้นเดียวป้องกันการเกิดลิ่มเลือด (**thrombosis**) และรักษาไว้ซึ่งภาวะการห้ามเลือด (**hemostasis**) อย่างไรก็ตามหลังจากได้รับการกระตุ้น เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดจะสนับสนุนให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (**coagulation**) และการเกิดลิ่มเลือด (**thrombosis**) ซึ่งเป็นจุดเด่นของผู้ป่วยโควิด 19 ในรายที่รุนแรง ผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีการเพิ่ม **circulating markers** ของการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด ซึ่งรวมทั้ง **von Willebrand factor (vWF)**, **plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1)**, **intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)**, **vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)**, ตลอดจน **P-selectin (6-10)** จากการชันสูตรพลิกศพผู้ที่เสียชีวิตจากโรคโควิด 19 เปิดเผยให้เห็นการทำลายตัวเอง (**apoptosis**) ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่สำคัญ รวมทั้งการสูญเสีย **tight junction integrity** ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดใน **pulmonary microvasculature (11)** ถึงแม้ว่ามีข้อที่ชวนให้เชื่อได้ว่าภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (**endotheliopathy**) ที่สัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโควิด 19 มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (**12, 13**) แต่จากหลักฐานเมื่อเร็ว ๆ นี้ก็ทำให้น่าเชื่อได้ว่ามีกลไกโดยอ้อม (ไม่ใช่ไวรัส) ที่ผลักดันให้เกิดการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคโควิด 19 (**14**)

เกล็ดเลือดเป็นเซลล์ชนิด **anucleate** ในเลือดที่รับรู้กันมานานแล้วว่ามียบทบาทในการห้ามเลือด (**hemostasis**) และการเกิดลิ่มเลือด (**thrombosis**) นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังทำหน้าที่รักษา **function** และ **integrity** ของหลอดเลือด โดยผ่านปฏิกิริยาแบบสองทิศทางกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดและ **leukocytes (15)** ภายใต้สภาวะการอักเสบการส่งสัญญาณที่ส่งผลกระทบ (**cross-talk**) ระหว่างเกล็ดเลือด การแข็งตัวของเลือด (**coagulation**) และเยื่อบุผนังหลอดเลือดจะทำให้การอักเสบทั้งเฉพาะจุดและทั้งระบบมีความรุนแรงขึ้น (**16-20**) เมื่อก่อนนี้เราพบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างซาร์สโคโรนาไวรัส 2 กับเกล็ดเลือดเป็นตัวขับเคลื่อนให้เกิดฟิโนไทป์ของเกล็ดเลือดชนิด **hyperactive** และในบริบทของการติดเชื้อจากไวรัสเกล็ดเลือดจะก่อให้เกิดการกระตุ้นที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (**21**) เนื่องจากเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นจะปลดปล่อย **inflammatory factors** ในภาวะแวดล้อมจุลภาคเฉพาะที่

(local microenvironment) เราจึงได้ตั้งสมมติฐานว่าปฏิกิริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19 เป็นตัวสนับสนุนให้เกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endotheliopathy)

ในที่นี้เราได้แสดงให้เห็นว่าเกล็ดเลือดจากผู้ป่วยโควิด 19 มีลักษณะเป็น **hyperactive** และ **factors** ต่าง ๆ ที่เกล็ดเลือดปลดปล่อยออกมาเป็นตัวกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular ECs) ซึ่งสนับสนุนให้เกิดไฟโนไทป์ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบและภาวะการเกิดลิ่มเลือดอุดตันได้ง่ายกว่าปกติ การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ **transcriptome** ในเกล็ดเลือดเปิดเผยให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญนับเป็นพัน ๆ ในผู้ป่วยโควิด 19 และการเพิ่มความเข้มข้นของวิถีที่สัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อย **organelle/granule** กระบวนการเผาผลาญอาหาร ตลอดจนการทำงานของ **immune effector** การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับยีน **candidate** ของเกล็ดเลือดซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรมสำหรับโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาอย่างมากมายทำให้มี **up-regulation** ของยีน **S100A8** และยีน **S100A9** ในเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 ในการทดลองในหลอดทดลองเรายืนยันว่าเชื้อซาร์ส โควนาไวรัส 2 สามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน **megakaryocyte** และ **up-regulate** ยีน **S100A8** และยีน **S100A9** ได้ และ **myeloid-related protein 8 (MRP8)/MRP14** ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ **heterodimer protein** ของยีน **S100A8/A9** ก็มีการปลดปล่อยออกมาในปริมาณมากมายจากเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มควบคุม (controls) ซึ่งสอดคล้องตรงกันกับการเพิ่มขึ้นของกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) **MRP8/14** กระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular ECs) และทำให้การเชื่อมต่อกัน (contacts) ระหว่างเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดมีความอ่อนแอ ส่งผลให้เยื่อบุผนังหลอดเลือดมีการซึมผ่านได้มากขึ้น (22) และดังนั้นจึงแสดงถึง **pathogenic mediator** ที่สำคัญของปฏิกิริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ทำให้เกิดการอักเสบ (inflammatory platelet-EC interactions) ในผู้ป่วยโควิด 19

การที่เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดมีการสัมผัสกับสารต่าง ๆ ที่เกล็ดเลือดปลดปล่อยออกมา (platelet releasate) ในผู้ป่วยโควิด 19 กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญในการถอดรหัสพันธุกรรมและไฟโนไทป์เมื่อเปรียบเทียบกับสัมผัสกับสารต่าง ๆ ที่เกล็ดเลือดปลดปล่อยออกมา (platelet releasate) ในกลุ่มควบคุม (controls) เราพบความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันโดยตรงอย่างสม่ำเสมอระหว่าง **MRP8/14** ที่เกล็ดเลือดปลดปล่อยออกมากับการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในวิถีที่เป็นลักษณะเฉพาะของ **tight junctions** ระหว่างเซลล์ การแข็งตัวของเลือด และกระบวนการต่าง ๆ ที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบมีการสหสัมพันธ์กับ **transcriptome** ของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีความผิดปกติ รวมทั้งการแสดงออกของอาร์เอ็นเอและผลิตภัณฑ์โปรตีนของยีน **S100A8/A9** การเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับการถอดรหัสพันธุกรรม (transcriptomic changes) เหล่านี้สะท้อนให้เห็นได้จากการที่มีการผลิต **classical inflammatory cytokines interleukin 6 (IL6)** และ **IL8** เพิ่มมากขึ้น และสหสัมพันธ์ระหว่างเกล็ดเลือดและ **transcriptome** ของเยื่อบุผนังหลอดเลือดกับการกระตุ้นของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ในกลุ่ม (cohort) ผู้ป่วยโควิด 19 จำนวนทั้งสิ้น 291 รายที่เข้ารับการรักษาด่วนในโรงพยาบาลเราพบว่าระดับของ **circulating MRP8/14** มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับการเกิดลิ่มเลือดและการเสียชีวิตของผู้ป่วยในเวลาต่อมา หลังจากมีการปรับหลายตัวแปร (multivariable adjustment) การมุ่งเป้าการรักษาอย่างตรงจุด (therapeutic

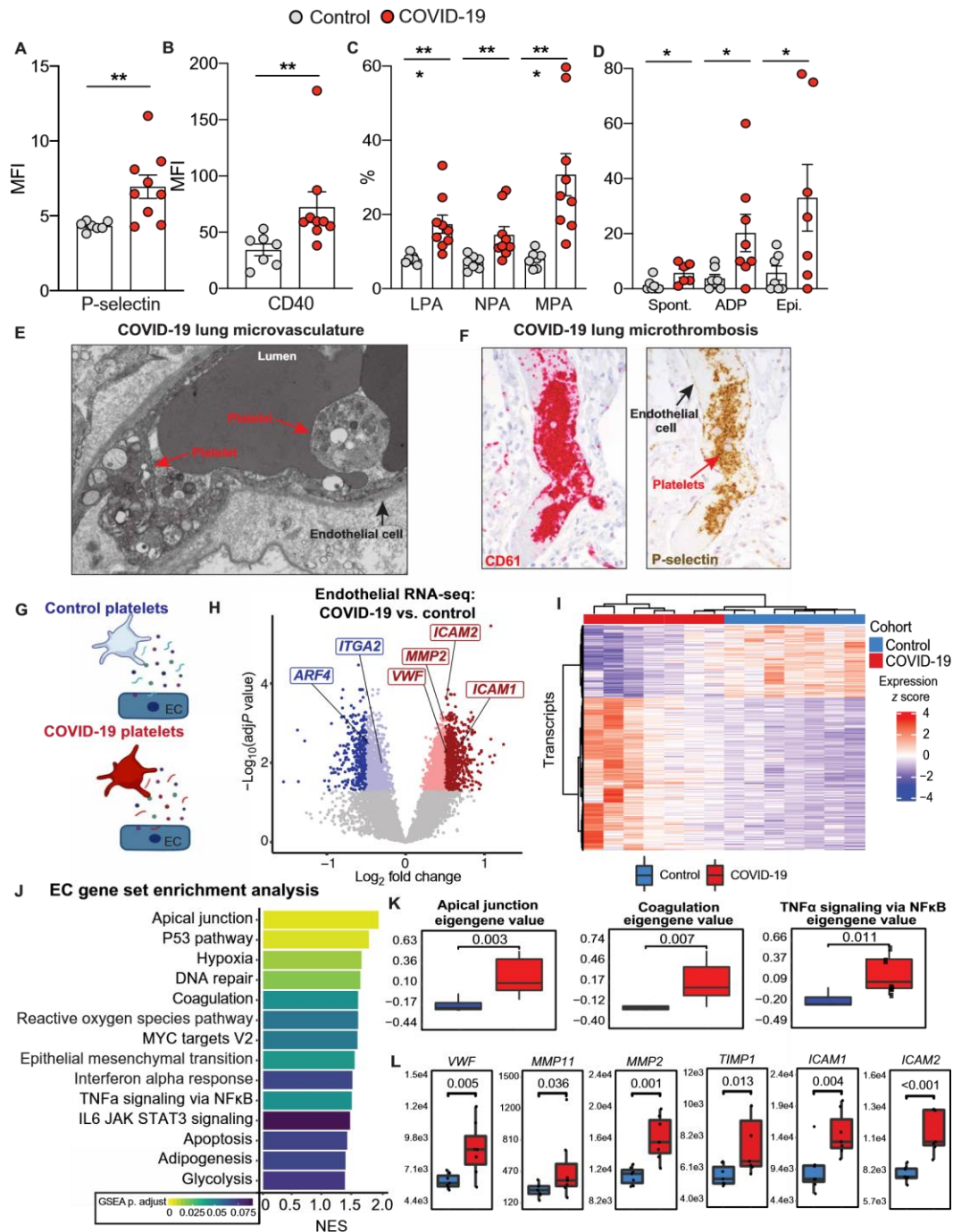
targeting) สำหรับ platelet P2Y₁₂ เป็นการลด *S100A8/A9* platelet mRNA และลดปฏิกิริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเยื่อผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบ (proinflammatory platelet-endothelial interactions)

โดยรวมแล้วข้อมูลของเราบ่งชี้ว่าเกล็ดเลือดทำให้การทำหน้าที่ที่ผิดปกติ (dysfunction) ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดมีเพิ่มมากขึ้น และเป็นสื่อกลาง (mediate) ให้เกิด thromboinflammation ในผู้ป่วยโควิด 19 กลยุทธ์วิธีการต่าง ๆ ในการลดการกระตุ้นเกล็ดเลือดอาจจะช่วยลดภาวะความผิดปกติของเยื่อผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่สัมพันธ์กับโควิด 19 และปรับปรุงผลลัพธ์ทางคลินิกที่เกี่ยวข้องกับ thromboinflammation ได้

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (RESULTS)

เกล็ดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19 กระตุ้นให้เกิดการทำหน้าที่ที่ผิดปกติ (dysfunction) ของเยื่อผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก

Hyperactivity ของเกล็ดเลือดได้รับการยอมรับเพิ่มมากขึ้นว่าเป็นจุดเด่นของโควิด 19 ([10](#), [23–25](#)) เราพบว่ามีปฏิกิริยาของเกล็ดเลือด (platelet reactivity) ที่เพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งได้รับการอธิบายลักษณะจากการแสดงออกของผิวหน้าของเกล็ดเลือด (platelet surface) ที่เพิ่มขึ้นของ P-selectin และ CD40 ([ภาพประกอบ 1, A และ B](#), และตาราง S1; $n =$ ผู้ป่วยโควิด 19 จำนวน 9 คนและกลุ่มควบคุม 7 คน) และ heteroaggregates ของ circulating platelet ซึ่งมีการเพิ่มขึ้น (ผลรวมทั้งหมด (aggregates) ระหว่างเกล็ดเลือดกับ leukocyte เกล็ดเลือดกับ neutrophil และเกล็ดเลือดกับ monocyte; [ภาพประกอบ 1C](#)) นอกจากนี้ผู้ป่วยโควิด 19 ยังมีผลรวมของเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้นที่เกิดโดยตัวมันเองและที่เกิดจากการตอบสนองต่อ submaximal ADP และ epinephrine ([ภาพประกอบ 1D](#))



ภาพประกอบ 1. เกิดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 มีลักษณะเป็น hyperreactive และเป็นตัวเร่งให้เกิดการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

(A) การแสดงออกของเกล็ดเลือด P-selectin และ (B) เกล็ดเลือด CD40 ที่ตรวจวัดได้ในเลือด (whole blood) โดยวิธี flow cytometry (C) ผลรวมของเกล็ดเลือด ระหว่างเกล็ดเลือดกับ leukocyte (LPA) เกล็ดเลือดกับ neutrophil (NPA) และเกล็ดเลือดกับ monocyte (MPA) ที่ตรวจวัดได้ในเลือด (whole blood) โดยวิธี flow cytometry ตามที่ประเมินโดยสถานะการ CD45⁺CD61⁺ (D) การหาปริมาณการรวมตัวของเกล็ดเลือดที่ตอบสนองต่อ phosphate-buffered saline (PBS) [การรวมตัวที่เกิดโดยตัวมันเอง (Spont.)], 0.1 μ M adenosine diphosphate (ADP), และ 0.1 μ M epinephrine (Epi.). การตรวจวัดทำในกลุ่มทดลองซึ่งเป็นผู้ป่วยจำนวน 7 คนและผู้ป่วยโควิด 19 ที่ได้รับการรักษาตัวในโรงพยาบาลจำนวน 9 คน (E) Transmission electron microscopy ของตัวอย่างในการชันสูตรพลิกศพจากปอดของผู้ป่วยโควิด 19 ซึ่งมุ่งเน้นไปที่การเชื่อมโยงระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (F) immunohistochemistry ของ CD61 (แดง) และของ P-selectin (น้ำตา) ในเนื้อเยื่อปอดของผู้ป่วยโควิด 19 หรือกลุ่มควบคุม (G) แผนผังของการทดลอง endothelial RNA-seq; เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กได้รับการ treat กับ platelet releasate ที่มาจากเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 หรือกลุ่มควบคุม (H) Volcano plot ของ transcripts ที่มีการแสดงออกต่าง ๆ กัน จุดที่เป็นสีน้ำเงินถึง adjP < 0.05; จุดแสดงหมายถึงเป็น up-regulated และจุดสีน้ำเงินหมายถึงเป็น down-regulated (I) แผนภูมิความร้อนในการหาความสัมพันธ์ตามลำดับชั้นตามธรรมชาติของ transcripts ที่มีการแสดงออกต่าง ๆ กันระหว่างเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่รับสัมผัสกับ releasate ของผู้ป่วยโควิด 19 กับ

releasate ของกลุ่มควบคุม ($\text{adj}P < 0.05$, $|\log_2\text{FoldChange}| > 0.5$) และ (J) วิถีที่ได้รับการเพิ่มความเข้มข้น (enriched pathways) ระหว่างในผู้ป่วยโควิด 19 กับในกลุ่มควบคุม โดยมีแถบเส้นแสดงคะแนนการเพิ่มความเข้มข้น (enrichment) ที่เป็นปกติ (K) Boxplots ของค่า eigengene เชิงสัมพันธ์สำหรับแต่ละตัวอย่างสำหรับ apical junction pathway, coagulation pathway, และ TNF α signaling pathway (L) Transcripts ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่เป็นจุดเด่นและระดับการแสดงออกหลังจากมีการรับสัมผัสกับโควิด 19 และ releasate ของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยกลุ่มควบคุม การทำ sequencing สำหรับอาร์เอ็นเอของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดซึ่งใช้ releasate ของเกล็ดเลือดจากกลุ่มควบคุมจำนวน 7 รายและจากผู้ป่วยโควิด 19 จำนวน 7 ราย อัตรา false discovery rate (FDR) ที่ได้รับการรายงาน – adjusted P values output จาก DESeq2. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ตามที่วัดจาก Student's t -test.

มีการสังเกตพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 มีภาวะความผิดปกติของเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) (11, 12) ภายใต้ภาวะการอักเสบ การส่งสัญญาณที่ส่งผลกระทบ (cross-talk) ระหว่างเกล็ดเลือดกับเยื่อบุผนังหลอดเลือดทำให้การอักเสบและภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติมีความรุนแรงมากขึ้น รวมทั้งทำให้ความสามารถของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในการสร้างไว้ซึ่งสภาวะสมดุลของหลอดเลือด (vascular homeostasis) ได้รับความเสียหายและอ่อนแอลง ความเชื่อมโยงกันระหว่างเกล็ดเลือดกับหลอดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19 ได้รับการสนับสนุนจากข้อมูลที่ได้จากการชันสูตรพลิกศพซึ่งแสดงให้เห็นถึงลิ่มเลือด (thrombi) ที่มีปริมาณเกล็ดเลือดมากมายทั้งในเส้นเลือดขนาดใหญ่และขนาดเล็ก (26) ซึ่งมีลักษณะโดดเด่นคือการกระตุ้นของเกล็ดเลือด (platelet activation) และการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังหลอดเลือด (ภาพประกอบ 1, E และ F) ทำให้เกิดการทำหน้าที่ที่ผิดปกติของหลอดเลือด (vascular dysfunction) เพิ่มขึ้นรวมทั้งการเกิดลิ่มเลือด (thrombosis) ด้วย (6, 7, 10, 23, 26, 27) ข้อมูลเมื่อเร็ว ๆ นี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 โดยตรงของเยื่อบุผนังหลอดเลือดไม่น่าจะเกิดขึ้นได้ (14) ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่าเกิดจากกลไกทางอ้อม ดังนั้นเราจึงได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในบริบทของโควิด 19

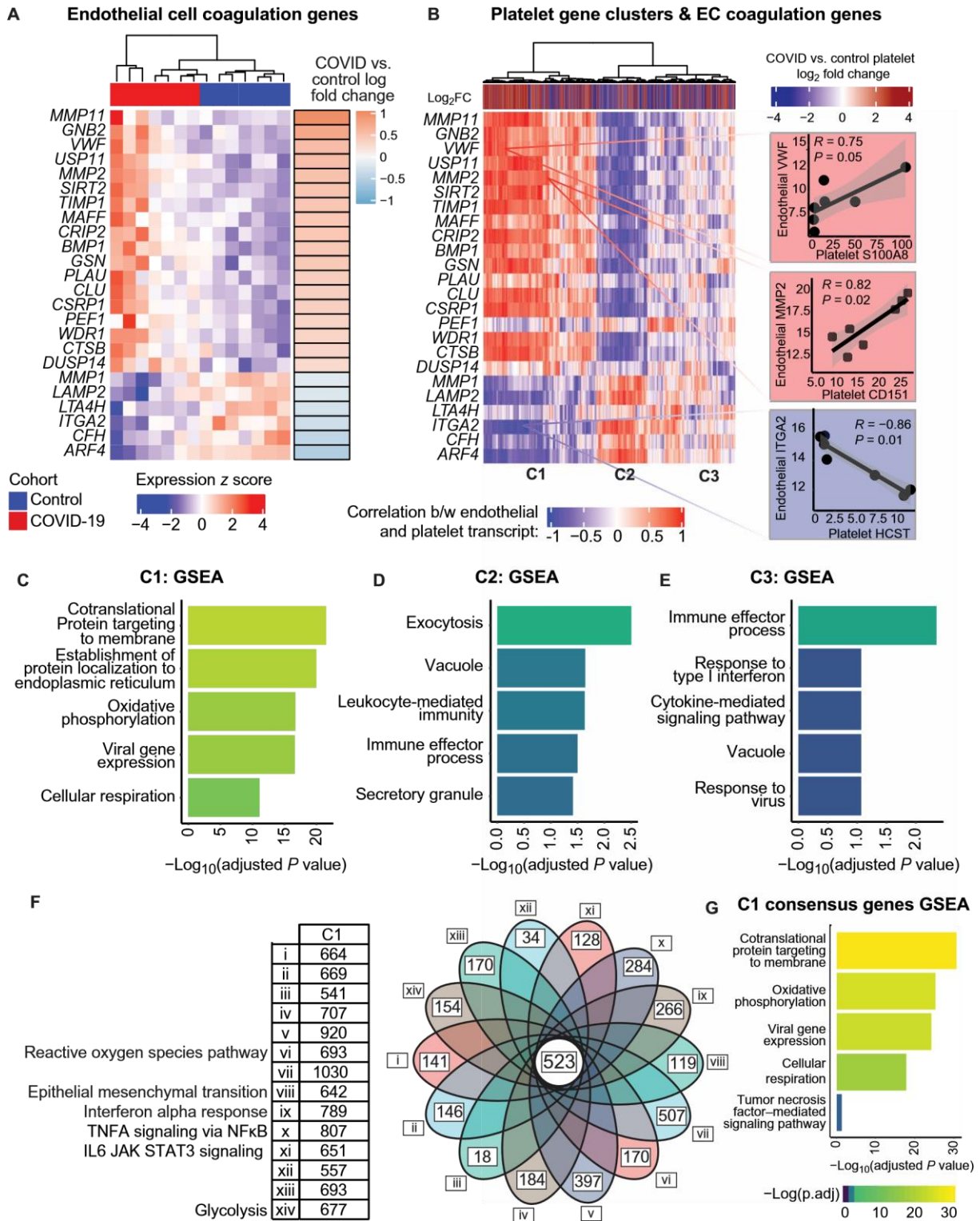
เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กของมนุษย์ได้รับการพัวพันกับ platelet releasate จากผู้ป่วยโควิด 19 หรือจากกลุ่มทดลอง และมีการทำ sequencing สำหรับอาร์เอ็นเอของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (RNA-seq) (ภาพประกอบ 1G และตาราง S1; n = ผู้ป่วยโควิด 19 จำนวน 7 คน และจากกลุ่มควบคุม 7 คน) การ treat เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กโดยใช้ releasate ของผู้ป่วยโควิด 19 ทำให้ transcriptome ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่มีจำนวน transcripts ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันทั้งสิ้น 1288 transcripts ($\text{adj}P < 0.01$, 485 transcripts down-regulated, 803 transcripts up-regulated; ภาพประกอบ 1H) transcripts ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอันดับต้น ๆ ได้แยกเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ได้รับการ treat กับ platelet releasate ของผู้ป่วยโควิด 19 ออกจากกลุ่มควบคุม (ภาพประกอบ 1I) การวิเคราะห์การเพิ่มความเข้มข้นของชุดยีน (gene set enrichment analysis - GSEA) สำหรับยีนต่าง ๆ ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันเปิดเผยให้เห็นถึงวิถีที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งเกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กันกับ tight junctions ระหว่างเซลล์ การแข็งตัวของเลือด ตลอดจนกระบวนการต่าง ๆ ที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบ (ภาพประกอบ 1J) ซึ่งเป็นจุดเด่นของ thromboinflammation และเพื่อที่จะประเมิน gene modules ที่เกิดความผิดปกติในผู้ป่วยโควิด 19 ต่อไป เราจึงได้ใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ weighted correlation network analysis ในการที่จะให้ได้มาซึ่ง eigengene ที่ represent การแสดงออกร่วมกันเชิงสัมพันธ์ (relative coexpression) ของชุดยีน (gene sets) เป็นแต่ละรายตัวอย่าง (28) เมื่อเปรียบเทียบค่า eigengene ของชุดยีน (gene sets) เหล่านี้ระหว่างผู้ป่วยโควิด 19 กับกลุ่มควบคุมพบว่า apical junction การแข็งตัวของเลือด ตลอดจนโปรตีนปัจจัยส่งเสริมการตายของเนื้องอก (tumor necrosis

factor α (TNF α) ซึ่งเป็นวิถีการส่งสัญญาณ (signaling pathways) ได้แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดที่ได้รับการ treat จากเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง (ภาพประกอบ 1K) ยีนของเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ภูมิคุ้มกัน และภาวะการแข็งตัวของเลือดง่ายกว่าปกติ (เช่น *VWF*, *MMP11*, *MMP2*, *TIMP1*, *ICAM1*, และ *ICAM2*) มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดที่ได้รับการ treat กับ releasate ของเกล็ดเลือดจากผู้ป่วยโควิด 19 (ภาพประกอบ 1L)

กลุ่มยีนเกล็ดเลือดที่แตกต่างชัดเจนเป็นตัวขับเคลื่อนความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือดในเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก (Distinct platelet gene clusters drive microvascular EC coagulation dysfunction)

สอดคล้องกับงานศึกษาวิจัยชิ้นอื่น ๆ คณะผู้วิจัยของเราได้จำแนกแยกแยะและบ่งชี้ transcriptome ของเกล็ดเลือดที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันและการอักเสบในผู้ป่วยโควิด 19 [GSE176480 (23)] ดังนั้นเราจึงได้ทำการบูรณาการการวิเคราะห์เกล็ดเลือดและการวิเคราะห์การทำ sequencing อาร์เอ็นเอของเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดเข้าด้วยกัน เพื่อให้เกิดความเข้าใจเชิงลึกในกลไกที่เน้นความสำคัญของการกระตุ้นเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดที่มีเกล็ดเลือดเป็นตัวเร่ง เมื่อมุ่งไปที่วิถีการแข็งตัวของเลือด (coagulation pathway) เราจึงได้รวมกลุ่มยีนในการแข็งตัวของเลือดซึ่งได้รับการกระตุ้นจากเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ($\text{adj}P < 0.05$) ระหว่างผู้ป่วยโควิด 19 กับกลุ่มควบคุม การรวมกลุ่มของยีนเหล่านี้ตามธรรมชาติ (unsupervised clustering) ส่งผลให้มีการแบ่งกลุ่มแยกกันอย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 2A) เพื่อที่จะจำแนกแยกแยะและบ่งชี้ transcripts ของเกล็ดเลือดที่ถูกกำหนดควบคุมโดยโควิด 19 และที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการแข็งตัวของเลือดจากเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือด เราจึงได้ทำการหา transcripts ของเกล็ดเลือดที่ได้รับการบ่งชี้ว่ามีการแสดงออกแตกต่างกันในผู้ป่วยโควิด 19 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพประกอบ S1 และตาราง S2; n = ผู้ป่วยโควิด 19 จำนวน 8 คน และกลุ่มควบคุมจำนวน 10 คน) หลังจากที่ได้แสดงความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันระหว่างยีนในการแข็งตัวของเลือดซึ่งได้รับการกระตุ้นจากเซลล์เยื่อพวงผนังหลอดเลือดที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (ภาพประกอบ 2A) กับยีนของเกล็ดเลือดซึ่งมีการแสดงออกแตกต่างกันในผู้ป่วยโควิด 19 (ภาพประกอบ 2B) เราได้จำแนกแยกแยะและบ่งชี้กลุ่มยีนของเกล็ดเลือดที่แตกต่างชัดเจนจำนวน 3 กลุ่ม (C1 ถึง C3; ตาราง S3) ต่อจากนั้นมีการทำ hypergeometric GSEA tests กับกลุ่มยีนแต่ละกลุ่มเพื่อหา functional makeup ของแต่ละกลุ่ม กลุ่ม C1 ซึ่งประกอบด้วยยีนของเกล็ดเลือดซึ่งมีการแสดงออกแตกต่างกันจำนวน 920 ยีนได้รับการเพิ่มความเข้มข้นในวิถีที่สัมพันธ์กับการปลดปล่อย organelle/granule และ oxidative phosphorylation ซึ่งเป็นวิถี (pathways) ที่เป็นลักษณะเด่นของไฟโบรบลาสต์ของเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้น (ภาพประกอบ 2C) (29) กลุ่มยีน C2 (มียีนซึ่งมีการแสดงออกแตกต่างกันจำนวน 413 ยีน) ได้รับการเพิ่มความเข้มข้นในวิถีของเกล็ดเลือด (platelet pathways) ที่เชื่อมโยงกับการหลั่ง granule และ immune effector functions ในขณะที่กลุ่มยีน C3 (มียีนซึ่งมีการแสดงออกแตกต่างกันจำนวน 715 ยีน) ประกอบด้วยวิถี (pathways) ที่สัมพันธ์กับการตอบสนองการส่งสัญญาณจาก cytokine และ interferon ตลอดจนกระบวนการของ immune effector เป็นหลัก (ภาพประกอบ 2, D และ E) โดยรวมแล้ว

ข้อมูลเหล่านี้เน้นให้ความสำคัญไปที่การที่ฟิโนไทป์ของเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นในผู้ป่วยโควิดมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องโดยตรงอย่างไรกับการแข็งตัวของเลือดซึ่งได้รับการกระตุ้นจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เราสังเกตพบกลุ่มเกล็ดเลือดที่มีความสม่ำเสมอ (**consistent platelet clusters**) สำหรับวิถีของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของ **tight junctions** ระหว่างเซลล์ซึ่งมีเกล็ดเลือดที่ได้รับการเพิ่มความเข้มข้นเป็นสื่อกลาง(ภาพประกอบ **S2, A และ B**) และ **TNF α signaling** (ภาพประกอบ **S2, C และ D**)



ภาพประกอบ 2. กลุ่มยีนเกิดเลือดผู้ป่วยโควิด 19 กระตุ้นให้เกิดฟิโนไทป์ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มให้เกิดการแข็งตัวของเลือด

(A) แผนภูมิความร่อนของ transcripts เชื้อบวมงหลอดเลือดที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ($\text{adj}P < 0.05$) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของการเรียงตัวของเลือด (B) แผนภูมิความร่อนของค่าสหสัมพันธ์สำหรับการแสดงออกของยีนเกล็ดเลือดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันแต่ละยีน (ระหว่างผู้ป่วยโควิด 19 กับกลุ่มควบคุม) กับการแสดงออกของแต่ละยีนจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในวิธีการเรียงตัวของเลือด กลุ่มที่น่าสนใจถูกกำหนดโดย C1, C2, และ C3 Insets ของสหสัมพันธ์เป็นคู่ ๆ จำนวน 3 คู่แสดง VWF ของเยื่อบุผนังหลอดเลือดเปรียบเทียบกับ S100A8 ของเกล็ดเลือด ระหว่าง MMP2 ของเยื่อบุผนังหลอดเลือดเปรียบเทียบกับ CD151 ของเกล็ดเลือด และระหว่าง ITGA2 ของเยื่อบุผนังหลอดเลือดกับ HCST ของเกล็ดเลือด (C ถึง E) ผล GSEA สำหรับ C1, C2, และ C3 (F) จำนวนของยีนเกล็ดเลือดจาก C1 module ข้ามวิถีของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีการแสดงออกแตกต่างกันและแผนภูมิ Venn ซึ่งแสดงการทับซ้อนกันของชุด C1 ทั้งหมด ส่วนที่มีการ label แสดงถึงจำนวนของยีนที่พิเศษแตกต่างจากจุดเด่นประจำตัวแต่ละอย่าง และการทับซ้อนของโมดูลยีนเกล็ดเลือด C1 ทุกโมดูล (G) ผล GSEA สำหรับโมดูลยีน C1 ที่ทับซ้อนกัน

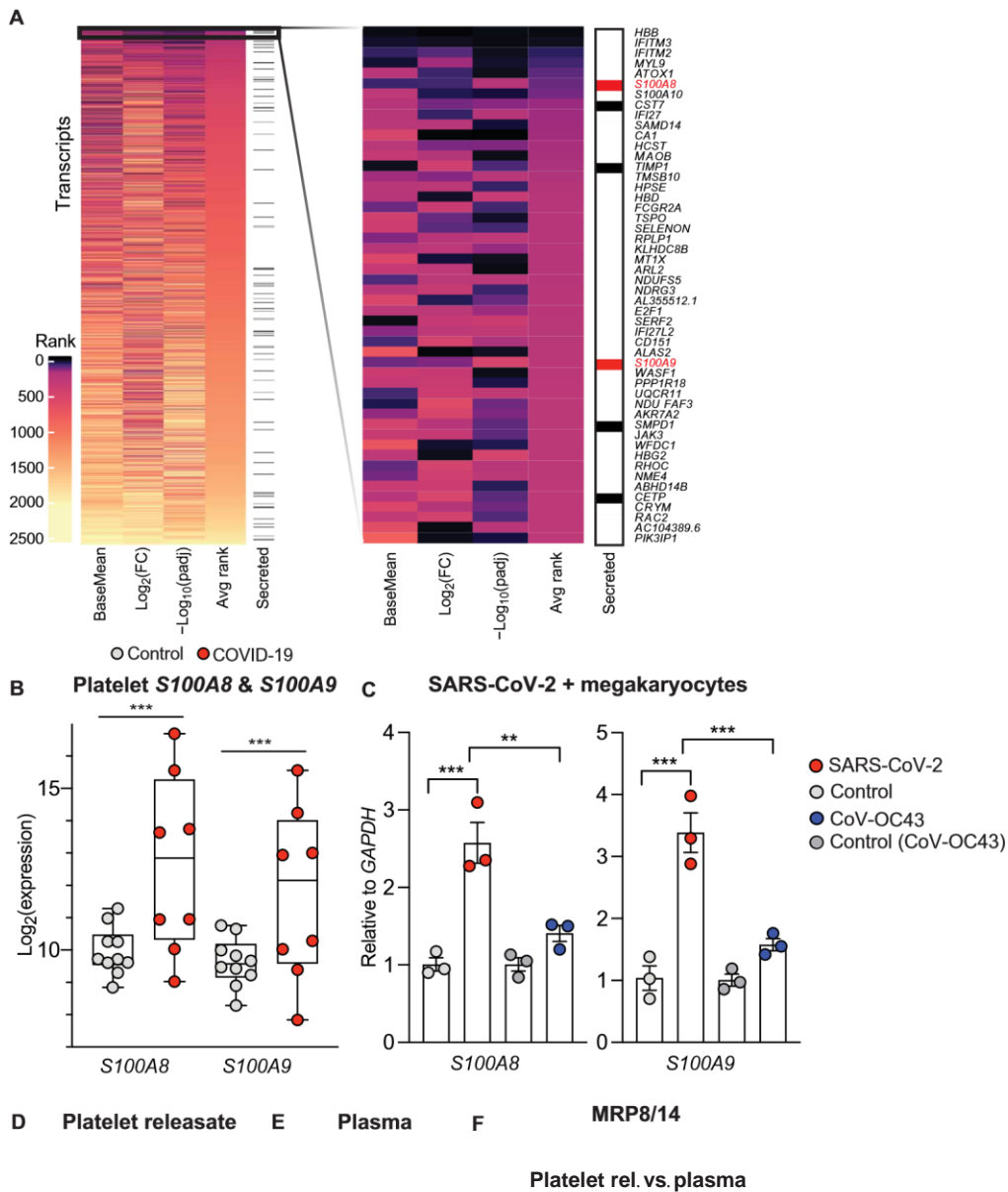
เพื่อที่จะหาความสัมพันธ์กันระหว่าง transcriptomic signature ของเกล็ดเลือดผู้ป่วย

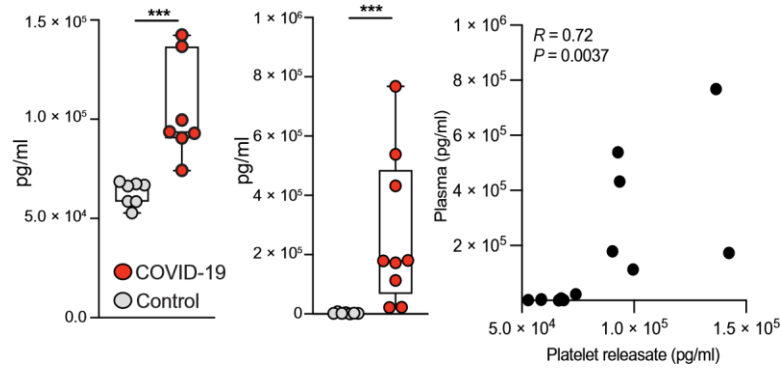
โควิด 19 กับเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดต่อไป เราได้ทำการตรวจวิเคราะห์ซ้ำข้ามวิถีเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ up-regulated ยีนเกล็ดเลือด 3 กลุ่มที่โดดเด่นแตกต่างกันได้รับการระบุบนพื้นฐานของการรวมกลุ่มตามธรรมชาติซึ่งสอดคล้องตรงกันในการตรวจวิเคราะห์แต่ละครั้ง กลุ่มที่ 1 (C1) มีลักษณะร่วมกันอย่างหนึ่งคือมีจุดเด่นประจำตัวของยีนเกล็ดเลือด (a 523-platelet gene signature) ตลอดทุกวิถีของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ up-regulated ซึ่งมีการเพิ่มความเข้มข้น (ภาพประกอบ 2F และตาราง S4) การวิเคราะห์การเพิ่มความเข้มข้นของชุดยีน (gene set enrichment analysis - GSEA) เปิดเผยให้เห็น platelet EC-activating signature อย่างเดียวกัน เพื่อที่จะได้รับการเพิ่มความเข้มข้นในชุดยีนที่เชื่อมโยงกับการ target โปรตีนเยื่อหุ้มเซลล์ ปฏิกริยา oxidative phosphorylation รวมทั้งการแสดงออกของยีนไวรัส (ภาพประกอบ 2G) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าวิถีการกระตุ้นของเกล็ดเลือด (platelet-activating pathways) มีความเชื่อมโยงกับการปลดปล่อย granule/vesicle กระบวนการเผาผลาญอาหาร และการทำงานของ immune effector รวมทั้งการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสดังนี้เป็นตัวเร่งให้เกิดฟีโนไทป์ที่มีการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (EC activation phenotype) ที่สอดคล้องกันกับภาวะความผิดปกติของเยื่อผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ในโรคโควิด 19 ตามที่ได้อธิบายมา

ยีนเกล็ดเลือด S100A8/A9 ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อซาร์โคโรนาไวรัส 2 และเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19

ต่อจากนั้นเราต้องการที่จะระบุปัจจัยต่าง ๆ ที่เกล็ดเลือดปลดปล่อยออกมา ที่กระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด การวิเคราะห์วิถีทางภววิทยา (ontology pathway analysis) ของยีนสำหรับ transcripts ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันเปิดเผยให้เห็นถึง up-regulation ของวิถีการสลายเกล็ดเลือด (platelet degranulation) ในผู้ป่วยโควิด 19 (ภาพประกอบ S3A) ดังนั้นเราจึงได้ทำการตรวจหา yin candidate ของเกล็ดเลือดซึ่งเป็นรหัสพันธุกรรมสำหรับโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาอย่างมากมายซึ่งมีการแสดงออกแตกต่างกันในผู้ป่วยโควิด 19 จากการที่ใช้ platelet RNA-seq metrics ของการแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างในผู้ป่วยโควิด 19 และในกลุ่มควบคุม (ที่มีอายุ เพศ เชื้อชาติ และโรคประจำตัวตรงกัน ในตาราง S2, \log_2FC และ $\text{adj}P$ value) และความอุดมโดยรวม (ค่าเฉลี่ยพื้นฐาน) ของยีน เราได้ทำการประเมิน candidates 50 อันดับแรก (ค่าเฉลี่ยพื้นฐาน > 323 , $\log_2FC > 1.6$, $\text{adj}P < 1.03 \times 10^{-4}$) จากการทำ cross-referencing รายการยีน candidate เหล่านี้กับฐานข้อมูล secretome (30) ทำให้จำนวนยีนลดลงเป็น 6 ชนิด ได้แก่ S100A8, CST7, TIMP1, S100A9, SMPD1, และ CETP (ภาพประกอบ 3A) ในบรรดา yin 6 ชนิดเหล่านี้ yin S100A8 และ S100A9 เป็น yin เพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ผ่านเกณฑ์ทั้งหมดและก็ยังอยู่ในกลุ่ม 523-C1 platelet gene signature (ภาพประกอบ 2F) yin S100A8 และ S100A9 เป็นรหัสพันธุกรรมสำหรับ MRP8 และ MRP14 และอยู่ในบรรดา transcripts 4 อันดับแรกที่ได้รับการ

ระบุ ซึ่งอุดมไปด้วยเกล็ดเลือดจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีผลิตภัณฑ์ที่ถูกปลดปล่อยออกมา (ภาพประกอบ 3, A และ B) MRP8 และ MRP14 มีการ heterodimerize เพื่อที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับการอักเสบคือ MRP8/14 (calprotectin) ซึ่งเป็นโปรตีนเกี่ยวกับการอักเสบที่มีอยู่ใน granules เกล็ดเลือดและปลดปล่อยออกมาจากเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้น (31, 32)





ภาพประกอบ 3. ซาร์โคโรนาไวรัส 2 up-regulates ยีน *S100A8/A9* ของเกล็ดเลือดและ megakaryocyte และการปลดปล่อย MRP8/14

(A) การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 เปรียบเทียบกับเกล็ดเลือดของกลุ่มควบคุมโดยอิงตามการแสดงออกของค่าเฉลี่ยพื้นฐาน \log_2 (FoldChange) และค่า adjusted *P* value ระหว่างเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 กับเกล็ดเลือดของกลุ่มควบคุม. Subset zooms in ของยีน candidates 50 อันดับแรกโดยที่ *S100A8* และ *S100A9* ได้รับการ highlight. (B) การแสดงออกของ mRNA เกล็ดเลือดสำหรับ *S100A8* และ *S100A9*. *N* = 7 ตัวอย่างต่อกลุ่ม ****P* < 0.001 FDR-adjusted *P* values output จาก DESeq2. (C) การแสดงออกของ CD34-derived megakaryocyte mRNA สำหรับ *S100A8* และ *S100A9* หลังจากได้รับการ treat กับ PBS, SARS-CoV-2, หรือ CoV-OC43 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง. *N* = 3 ตัวอย่างต่อกลุ่ม ***P* < 0.005, ****P* < 0.001 โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (ANOVA). (D และ E) ความเข้มข้นของ releasate เกล็ดเลือดและของพลาสมาสำหรับ MRP8/14. *N* = 7 ถึง 9 ตัวอย่างต่อกลุ่ม; means \pm SEM; ***P* < 0.005, ****P* < 0.0005 ตามที่กำหนดจาก Student's *t* test. (F) สหสัมพันธ์ระหว่างพลาสมา กับ platelet releasate MRP8/14.

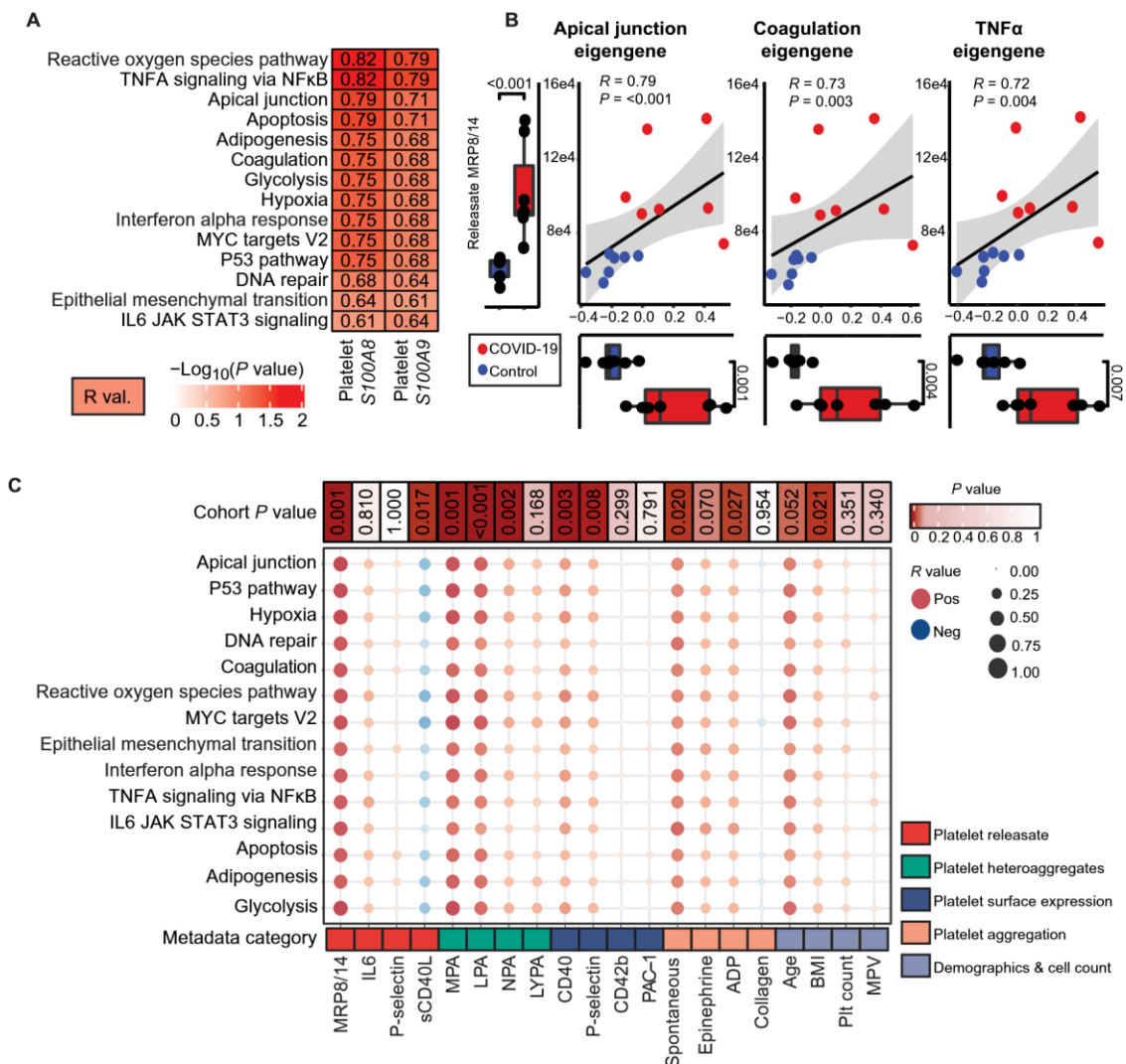
เพื่อที่จะหาว่าปฏิกิริยาระหว่างไวรัสกับ megakaryocyte สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงต่อ transcriptome ของเกล็ดเลือดได้หรือไม่ เราจึงได้ทำการพักตัว megakaryocytes ของมนุษย์ที่ได้จาก CD34 กับเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 และกับเชื้อโคโรนาไวรัสที่เป็นสาเหตุของไข้หวัด (CoV-OC43) การทำ treatment นี้ไปสู่การตรวจพบ mRNA ของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ภายใน megakaryocytes อย่างไรก็ดีไม่พบการ uptake สำหรับเชื้อ CoV-OC43 (ภาพประกอบ S4A) พบว่าทั้งใน primary human megakaryocytes และใน megakaryocyte cell line (Meg-01) การ treatment กับเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้การแสดงออกของ *S100A8* และ *S100A9* มีการเพิ่มขึ้น (*P* < 0.01; [ภาพประกอบ 3C](#) และภาพประกอบ S4B) ในทางกลับกันการ treatment กับ CoV-OC43 ไม่มีผลใด ๆ ([ภาพประกอบ 3C](#) และภาพประกอบ S4B) ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่ามีผลจำเพาะจากการเป็นสื่อกลางของเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2

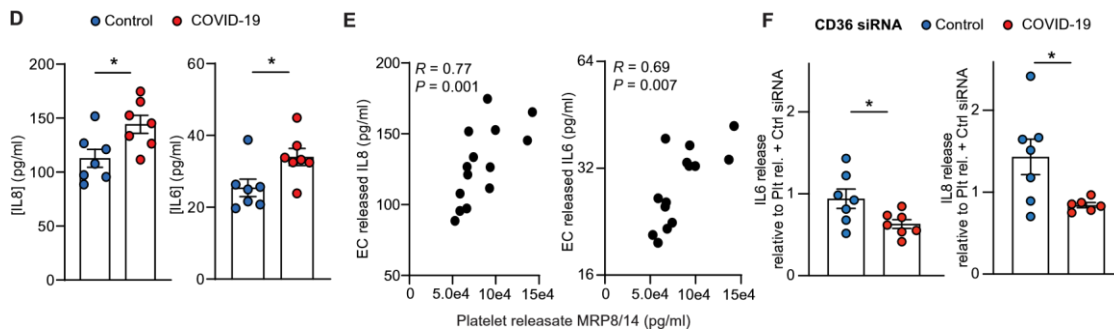
ต่อจากนั้นเราได้ทำการตรวจวัดการปลดปล่อย MRP8/14 จากเกล็ดเลือดและพบว่าเกล็ดเลือดที่ปลดปล่อยออกมาในผู้ป่วยโควิด 19 ทำให้ระดับ MRP8/14 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ([ภาพประกอบ 3D](#); *P* < 0.001) นอกจากนี้แล้วก็ยังมีการเพิ่มขึ้นของระดับ circulating plasma สำหรับ MRP8/14 ในผู้ป่วยโควิด 19 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลอง ([ภาพประกอบ 3E](#); *P* < 0.001, *n* = ผู้ป่วยโควิด 19 จำนวน 9 คนและกลุ่มควบคุมจำนวน 7 คน) พบว่ามีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างระดับของ MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดกับระดับของพลาสมา ([ภาพประกอบ 3E](#); *R* = 0.72, *P* = 0.0037) ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่า MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดเป็นส่วนหนึ่งของ ระดับของ MRP8/14 ที่ไหลเวียนอยู่ทั้งหมด ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าปฏิกิริยาโดยตรงกับ เชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ *S100A8/A9* transcription การผลิต MRP8/14 ตลอดจนการปลดปล่อยจาก megakaryocytes และเกล็ดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19

MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดเป็นตัวขับเคลื่อนความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

ต่อจากนั้นเราได้ทำการตรวจหาความสัมพันธ์กันระหว่าง MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดกับการกระตุ้นของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

เราพบว่าการแสดงออกของ S100A8/A9 platelet mRNA มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญกับการแสดงออกของวิถีต่าง ๆ ที่มีความผิดปกติที่พบในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีการรับสัมผัสกับโควิด 19 (ภาพประกอบ 4A) ซึ่งเป็นการเน้นถึงความสำคัญของบทบาทส่วนกลาง (central role) ของ MRP8/14 ในการขับเคลื่อนความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เรื่องนี้ยังได้รับการสนับสนุนเพิ่มเติมจากสหสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดกับวิถีที่ได้รับการเพิ่มความเข้มข้นจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดของผู้ป่วยโควิด 19 (ภาพประกอบ 4B)





ภาพประกอบ 4. MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

(A) สหสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ platelet *S100A8/9* mRNA กับการแสดงออกของวิถีเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ระบุได้รับการเพิ่มความเข้มข้นภายหลังจากการสัมผัสกับ platelet releasate ที่ได้รับมาจากโควิด 19 (B) Boxplots ของ platelet MRP8/14 releasate ในตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 และตัวอย่างจากกลุ่มควบคุม (y axis) และ boxplots ของค่า relative eigengene สำหรับวิถีการส่งสัญญาณของ apical junction ของการแข็งตัวของเลือด และ TNFα (แกน X) สหสัมพันธ์ระหว่าง respective values แสดงเป็น scatterplots (C) Dotplot แสดง correlation value ของการแสดงออกของ relative eigengene ของแต่ละวิถีกับ respective metadata metric ของวิถีนั้น ๆ วิธีที่มีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดแสดงบนแกน y และ metadata ต่าง ๆ แสดงบนแกน X คำอธิบายประกอบข้างบนแสดงให้เห็นค่า Wilcoxon P value สำหรับความแตกต่างของประชากรของ respective metadata metric ระหว่างตัวอย่างจากผู้ป่วยโควิด 19 และตัวอย่างจากกลุ่มควบคุม Platelet heteroaggregates ซึ่งประกอบด้วย MPA, leukocyte platelet aggregates (LPA), NPA, lymphocyte platelet aggregates (LYPA). Platelet aggregation ซึ่งได้แก่ Spontaneous (PBS), submaximal ADP (0.1 μM), epinephrine (0.1 μM), collagen (0.2 μM). ปริมาตรเฉลี่ยของเกล็ดเลือด (Mean platelet volume - MPV). (D) ปริมาณการปลดปล่อย IL8 และ IL6 จากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กที่ตอบสนองต่อ treatment กับ platelet releasate ที่ได้รับการเพาะแยกเชื้อจากผู้ป่วยโควิด 19 หรือกลุ่มควบคุม ข้อมูลที่ได้มาจากค่าเฉลี่ย ± SEM; *P < 0.05 ตามที่ระบุโดย t test (E) สหสัมพันธ์ระหว่าง IL6 และ IL8 ที่ปลดปล่อยจากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กกับความเข้มข้นของ MRP8/14 ใน platelet releasate (F) ปริมาณการปลดปล่อย IL8 และ IL6 จากเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กที่ตอบสนองต่อ treatment กับ platelet releasate ที่ได้รับการเพาะแยกเชื้อจากผู้ป่วยโควิด 19 หรือกลุ่มควบคุม CD36 silencing และ transfection ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดกับ CD36 small interfering RNA (siRNA) (หรือ ctrl siRNA) เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนการใส่ platelet releasate ข้อมูลแสดงโดยมีการสัมพันธ์กับแต่ละ corresponding vehicle control + platelet releasate และคือค่าเฉลี่ย ± SEM; *P < 0.05 ตามที่ระบุโดย t test; n = 6 ถึง 7 ตัวอย่างต่อหนึ่งกลุ่ม

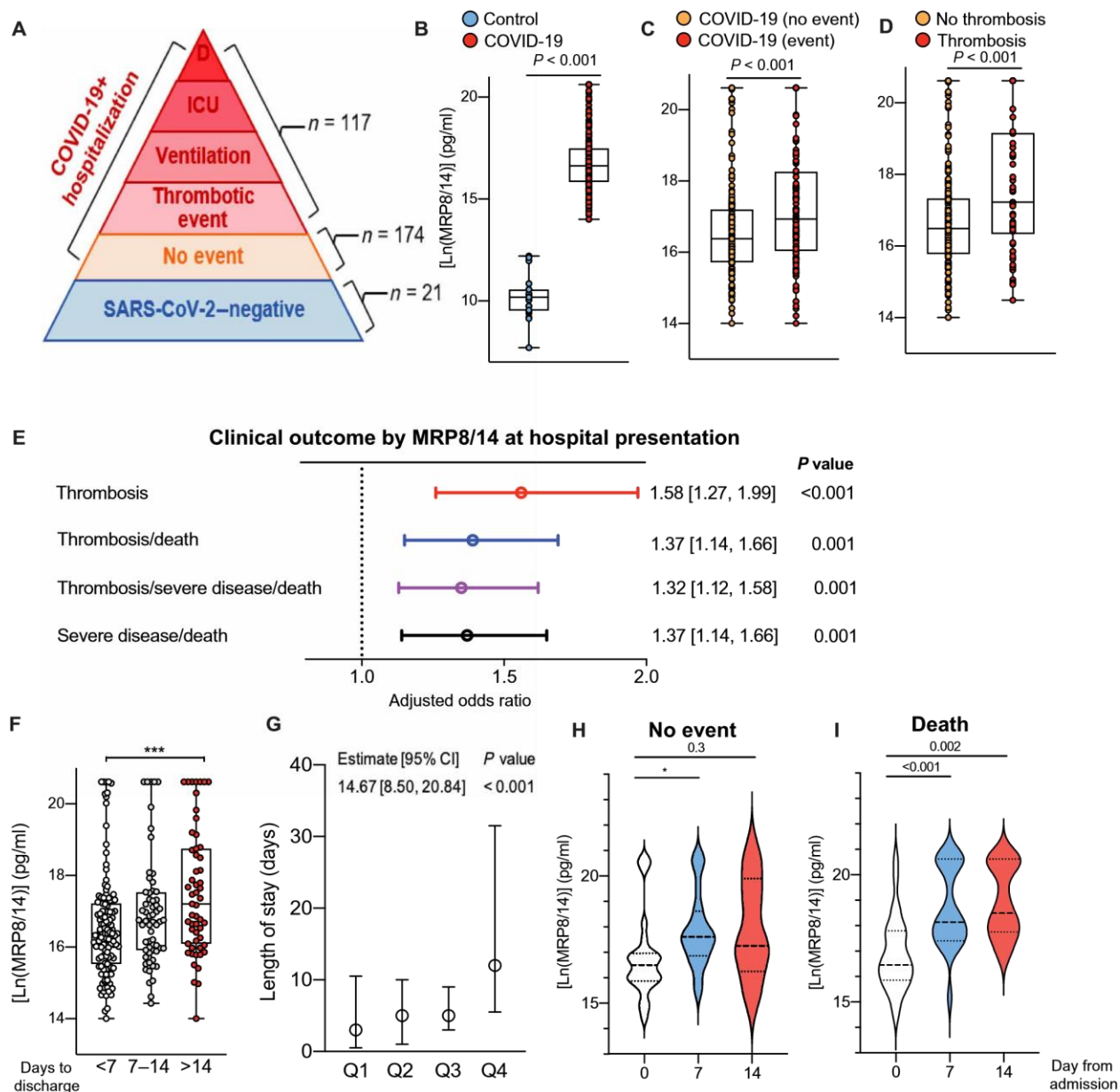
ต่อจากนั้นเราได้ทำการหาสหสัมพันธ์ระหว่างเมตริกซ์ต่าง ๆ ของการกระตุ้นของเกล็ดเลือด และการวัดทางคลินิกกับวิถีเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ได้รับการเพิ่มความเข้มข้น เพื่อที่จะหาความสัมพันธ์ระหว่างการกระตุ้นของเกล็ดเลือดกับความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19 ต่อไป นอกเหนือจาก MRP8/14 ที่มาจากเกล็ดเลือดแล้วเรายังได้ทำการวัดปริมาณ factors ต่าง ๆ ที่ทราบกันว่าถูกปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดซึ่งมีการเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 (IL6, P-selectin และ sCD40L) (10, 23, 24) การแสดงออกของวิถีเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีความผิดปกติภายหลังจากรับสัมผัสกับ platelet releasate ในผู้ป่วยโควิด 19 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญมากที่สุดกับ MRP8/14 ที่เกล็ดเลือดปลดปล่อยออกมา (ภาพประกอบ 4C) การประเมินการวัดค่าปฏิกิริยาอาการของเกล็ดเลือดที่อธิบายได้ดี (platelet-leukocyte heteroaggregates, surface P-selectin, CD40, PAC-1, CD42b, และ platelet aggregation) เปิดเผยว่าถึงแม้ว่าการวัดค่า (measures) ทั้งหมดเหล่านี้มีการสหสัมพันธ์ (correlated) กับ transcriptomic signature ที่มีความผิดปกติก็ตาม แต่ circulating monocyte platelet aggregates (MPAs) มีความสัมพันธ์มากที่สุดกับการเปลี่ยนแปลงทาง transcriptomic ที่แสดงออกมา (ภาพประกอบ 4C) ข้อมูลเหล่านี้สอดคล้องกับสิ่งที่พบก่อนหน้านี้ว่า MRP-14 จากเกล็ดเลือดสนับสนุนส่งเสริมการสร้าง MPA และฟิโนไทป์ของโมโนไซต์ที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบ (31) Circulating neutrophil platelet aggregates (NPAs) มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำกับวิถีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ได้รับการเพิ่มความเข้มข้น ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่า neutrophils ไม่ได้มีส่วนสำคัญในการเกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่อาศัยเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลางในผู้ป่วยโควิด 19

MRP8/14 กระตุ้นเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก และทำให้การเชื่อมต่อนั้นระหว่างเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดแต่ละเซลล์อ่อนแอลง ส่งผลให้มีการซึมผ่านได้มากขึ้นของเยื่อผนังหลอดเลือด (22) ในการสนับสนุนเยื่อผนังหลอดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นต่อไป เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่ได้รับการ treat กับ platelet releasate จากผู้ป่วยโควิด 19 มีการหลั่ง cytokines IL8 และ IL6 ที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบในปริมาณที่มีนัยสำคัญมากขึ้น ($P < 0.05$; [ภาพประกอบ 4D](#)) มีสหสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง MRP8/14 ที่เกิดเลือดปลดปล่อยออกมากับการสร้าง IL8 และ IL6 ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็ก ($P = 0.001$ และ $P = 0.007$ ตามลำดับ [ภาพประกอบ 4E](#)) ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่า MRP8/14 จากเกล็ดเลือดเป็นตัวที่ขับเคลื่อนการกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด MRP8/14 เป็นลิแกนด์สำหรับ innate receptors รวมทั้ง Toll-like receptor 4 (TLR4), CD36, และ receptor สำหรับผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการไกลเคชันที่ก้าวหน้า (advanced glycation end products (RAGE)) (31, 33) การปิดกั้นการส่งสัญญาณของ TLR4 และ RAGE ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดไม่ได้เป็นการยับยั้งการผลิต cytokine IL6 หรือ IL8 ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่มีเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลาง (ภาพประกอบ S5) ในทางตรงกันข้ามการ silencing CD36 เป็นการยับยั้งการผลิต cytokine IL6 และ IL8 ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่มีเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลางในผู้ป่วยโควิด 19 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ([ภาพประกอบ 4E](#)) ข้อมูลเหล่านี้ทำให้เชื่อได้ว่า MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลางให้เกิดผลที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบของการอักเสบของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19 โดยผ่านทาง CD36 ความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันในทางคลินิกของสิ่งที่พบนี้ได้รับการสนับสนุนในเวลาต่อมาจากข้อมูลที่ได้จากการชันสูตรพลิกศพผู้เสียชีวิตจากโรคโควิด 19 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการผลิต IL6 เยื่อผนังหลอดเลือดในปอดอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพประกอบ S6)

MRP8/14 เกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับอาการทางคลินิกที่ไม่พึงประสงค์

เพื่อที่จะตรวจหาความเกี่ยวข้องสัมพันธ์ทางคลินิกของสิ่งที่เราค้นพบ เราจึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ MRP8/14 ในกลุ่ม (cohort) ผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล มีการเก็บตัวอย่างพลาสมาในวันแรก รับเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลจากผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 291 คนที่ป่วยด้วยโรคโควิด 19 ภายในเครือข่ายสุขภาพ Langone แห่ง New York University (NYU) ([ภาพประกอบ 5A](#)) ค่ากลางมัธยฐานอายุอยู่ที่ 65 ปี จำนวน 169 คน (58.1%) เป็นเพศหญิง และ 148 คน (50.9%) มีภาวะความดันโลหิตสูง ([ตาราง 1](#)) เหตุการณ์การเสียชีวิตหรือภาวะล้มเหลวอดุดตันเกิดขึ้นกับผู้ป่วย 86 ราย [44 รายเสียชีวิต และ 54 รายมีภาวะล้มเหลวอดุดตัน (22 รายมีภาวะล้มเหลวอดุดตันในหลอดเลือดดำส่วนลึก (deep venous thrombosis) 11 รายเป็นโรคล้มเหลวอดุดตันในหลอดเลือดปอด (pulmonary embolism) 8 รายเป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) 6 รายเป็นโรคหลอดเลือดสมอง (stroke) และ 7 รายมีอาการอื่น ๆ] ผู้ป่วยโควิด 19 ได้รับการเปรียบเทียบกับกลุ่ม (cohort) ผู้ป่วย 21 คนที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลซึ่งมีผลการตรวจหาเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นลบ ระดับของ Circulating MRP8/14 ในผู้ป่วยโควิด 19 สูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่ป่วยด้วยโรคอื่น ๆ (diseased controls) อย่างมีนัยสำคัญ ([ภาพประกอบ 5B](#) และ table S7) ในบรรดาผู้ป่วยโควิด 19 ด้วยกัน ผู้ป่วยที่มีอาการทางคลินิกที่ไม่พึงประสงค์ (ภาวะล้มเหลวอดุดตัน ภาวะเจ็บป่วยวิกฤต) มี MRP8/14 ในระดับสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ([ภาพประกอบ 5, C](#)

และ D และภาพประกอบ S7) ภายหลังจากมีการจัดปรับสำหรับอายุ เพศ เชื้อชาติ/ชาติพันธุ์ ดัชนีมวลกาย ภาวะโรคเบาหวาน (diabetes) โรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรัง (chronic obstructive pulmonary disease - COPD)/โรคหอบหืด (asthma) ประวัติการป่วยเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) หรือมะเร็ง (cancer) รวมทั้งการรักษาต้านเกล็ดเลือดและด้านการแข็งตัวของเลือด (antiplatelet and anticoagulant therapy) ระดับของ MRP8/14 ในพลาสมา มีการสัมพันธ์กันอย่างเป็นอิสระกับภาวะลิ่มเลือดอุดตัน [odds ratio ที่ปรับแล้ว (adjOR), 1.58; ช่วงความเชื่อมั่น 95%, 1.27 ถึง 1.99; $P < 0.001$] และกับอาการไม่พึงประสงค์อย่างอื่น (ภาพประกอบ 5E) เมื่อจัดแบ่งข้อมูลเป็นชั้น ๆ เป็นคอรัไทล์ ผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีระดับ MRP8/14 สูงสุดในระหว่างแรกรับเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีความเป็นไปได้ในการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันสูงกว่าถึง 3 เท่า (adjOR, 3.36; 95% CI, 1.68 to 6.76; $P = 0.001$) รวมทั้งการเกิดอาการไม่พึงประสงค์อย่างอื่น (ภาพประกอบ S8) ในจำนวนผู้ป่วย 247 รายที่ออกจากโรงพยาบาล ค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลอยู่ที่ 13.1 วัน ระดับของ Circulating MRP8/14 ในผู้ป่วยที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานกว่ามีค่าสูงกว่า (ภาพประกอบ 5, F และ G) หลังจากการปรับหลายตัวแปร (multivariable adjustment) ผู้ป่วยที่อยู่ในคอรัไทล์สูงสุดของ MRP8/14 พื้นฐานเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลนานเกิน 12.9 วัน (6.8 ถึง 19.0 วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับคอรัไทล์ 1 ถึง 3



ภาพประกอบ 5. Circulating MRP8/14 มีการสัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่ไม่พึงประสงค์ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล (A) ภาพสรุปของตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยโควิด 19 และจากผู้ป่วยกลุ่มควบคุมที่เก็บในระหว่างแรกเริ่มเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล (B และ C) plasma MRP8/14 ในกลุ่มควบคุม ($n = 21$) เปรียบเทียบกับในผู้ป่วยโควิด 19 ($n = 291$) และในผู้ป่วยโควิด 19 ที่จัดแบ่งชั้นตามอาการทางคลินิกที่ไม่พึงประสงค์ ($n = 174$) หรือไม่มีอาการทางคลินิกที่ไม่พึงประสงค์ ($n = 117$) (D) Plasma MRP8/14 ในผู้ป่วยโควิด 19 ที่จัดแบ่งชั้นตามภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (มีการลิ่มเลือดอุดตัน $n = 54$; ไม่มีภาวะลิ่มเลือดอุดตัน $n = 237$) (E) ORs ที่ปรับแล้วซึ่งสอดคล้องกับช่วงความเชื่อมั่น (Cis) ที่ 95% สำหรับการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน สำหรับการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันหรือการเสียชีวิต สำหรับการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันหรือการป่วยวิกฤตหรือการเสียชีวิต หรือการป่วยวิกฤตหรือการเสียชีวิตซึ่งอิงตาม plasma MRP8/14 ของผู้ป่วยโควิด 19 ในระหว่างแรกเริ่มเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล ORs ที่ปรับแล้วจากการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติกส์สำหรับระดับของ log-transformed biomarker ที่จัดปรับสำหรับอายุ เพศ เชื้อชาติ/ชาติพันธุ์ ดัชนีมวลกาย ภาวะโรคเบาหวาน (diabetes) โรคหลอดเลือดหัวใจ (chronic obstructive pulmonary disease - COPD)/โรคหอบหืด (asthma) และประวัติการป่วยเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) หรือมะเร็ง (cancer) (F) ระดับ MRP8/14 ในระหว่างแรกเริ่มเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล และจำนวนวันก่อนที่จะออกจากโรงพยาบาล (days to discharge) (G) ช่วงระยะเวลาการเข้าพักรักษาตัวโดยเฉลี่ยซึ่งอิงตามระดับ MRP8/14 ในระหว่างแรกเริ่มเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล และการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ plasma MRP8/14 ที่พื้นฐานและช่วงระยะเวลาการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล การวัด MRP8/14 ตามยาว (longitudinal) (H) ในผู้ที่ไม่มีอาการทางคลินิก และ (I) ในผู้ที่เสียชีวิตในเวลาต่อมา มีการทดสอบ Wilcoxon signed-rank test เพื่อตรวจวัดหาความแตกต่างของระดับ MRP8/14 ระหว่างวันที่ 7 และวันที่ 14 เปรียบเทียบกับค่าพื้นฐาน $*P < 0.05$, $**P < 0.005$

ตารางที่ 1. ข้อมูลด้านประชากรของผู้ป่วยโควิด 19

| | จำนวนประชากรทั้งหมด (n = 291) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| อายุ (มัธยฐาน) (IQR) | 65 (54, 75) |
| เพศ | |
| หญิง n (%) | 169 (58.1) |
| เชื้อชาติ/ชาติพันธุ์ | |
| สีขาว n (%) | 148 (52.9) |
| อเมริกันนิโกร n (%) | 42 (15.0) |
| ฮิสแปนิก n (%) | 6 (2.1) |
| เอเชีย n (%) | 33 (11.8) |
| อื่น ๆ n (%) | 49 (17.5) |
| ไม่ทราบหรือตอบปฏิเสธ n (%) | 2 (0.7) |
| โรคประจำตัว | |
| ดัชนีมวลกาย (มัธยฐาน) (IQR) | 27.4 (23.6, 31.9) |
| โรคหอบหืด (Asthma) n (%) | 26 (8.9) |
| โรคหลอดลมอุดกั้นเรื้อรัง (COPD) n (%) | 15 (5.2) |
| โรคหลอดเลือดหัวใจ (Coronary artery disease) n (%) | 37 (12.7) |
| เป็นผู้สูบบุหรี่หรืออยู่ในปัจจุบัน (Current smoker) n (%) | 10 (3.6) |
| ภาวะโรคเบาหวาน (Diabetes) n (%) | 76 (26.1) |
| ภาวะไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) n (%) | 75 (25.8) |
| ภาวะความดันโลหิตสูง (Hypertension) n (%) | 148 (50.9) |
| สัญญาณชีพในระหว่างแกร็บเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล | |
| อุณหภูมิ (°C) (มัธยฐาน) (IQR) | 37.3 (36.8, 38.2) |
| SpO ₂ , %, (มัธยฐาน) (IQR) | 92.0 (86.0, 96.0) |
| ดัชนีเกล็ดเลือดในระหว่างแกร็บเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล (Platelet indices on admission) | |
| ปริมาณของเกล็ดเลือด (Platelet count) (10 ³ /□l) (มัธยฐาน) (IQR) | 199 (157, 255) |
| ค่าเฉลี่ยปานกลางของปริมาตรเกล็ดเลือด (Mean platelet volume) (fl) (มัธยฐาน) (IQR) | 10.6 (10.0, 11.4) |
| Initial anticoagulant | |
| Prophylactic dose heparin, n (%) | 181 (62.2) |
| Therapeutic dose heparin, n (%) | 3 (1.0) |
| Oral anticoagulant*, n (%) | 19 (6.5) |
| No record of anticoagulant, n (%) | 88 (30.2) |
| Antiplatelet therapy | |
| Aspirin, n (%) | 61 (20.9) |
| Clopidogrel, n (%) | 7 (2.4) |

Clinical outcomes

| | |
|-------------------------------|------------|
| Death, <i>n</i> (%) | 44 (15.1) |
| ICU, <i>n</i> (%) | 81 (27.8) |
| Ventilation, <i>n</i> (%) | 70 (24.1) |
| Thrombosis, <i>n</i> (%) | 54 (18.6) |
| Severe disease†, <i>n</i> (%) | 107 (36.8) |

*Oral anticoagulant, warfarin, apixaban, or rivaroxaban.

†Severe disease (critically ill)—a composite outcome of ICU, mechanical ventilation, or death.

ตารางที่ 1. ข้อมูลด้านประชากรของผู้ป่วยโควิด 19

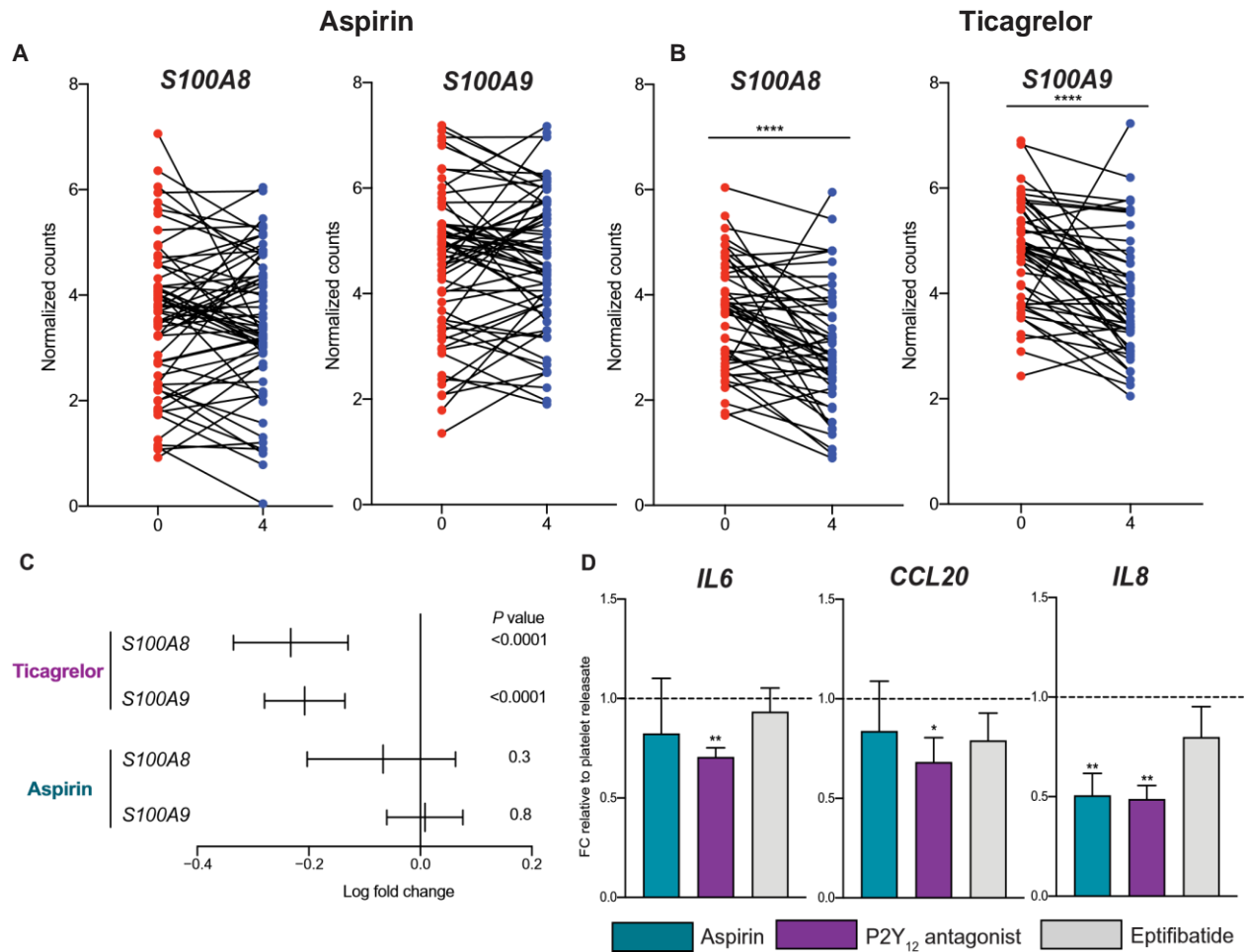
*Oral anticoagulant, warfarin, apixaban, or rivaroxaban.

†Severe disease (critically ill)—a composite outcome of ICU, mechanical ventilation, or death.

ในกลุ่มย่อย (subset) ของผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลจำนวน 107 คนมีการวัด circulating MRP8/14 ตามยาว (longitudinal) สำหรับในผู้ป่วยที่ไม่มีอาการทางคลินิกพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างในตอนแรกเริ่มเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลกับในวันที่ 14 (ภาพประกอบ 5H) ในขณะที่ผู้ป่วยที่เสียชีวิตในเวลาต่อมา MRP8/14 มีการเพิ่มสูงขึ้นถึงประมาณ 8 เท่าระหว่างค่าพื้นฐาน (baseline) กับในวันที่ 14 ($P = 0.002$; ภาพประกอบ 5I) แนวโน้มในลักษณะที่คล้ายคลึงกันนี้ยังพบในผู้ป่วยที่มีภาวะลิ่มเลือดอุดตันและอาการไม่พึงประสงค์อื่น ๆ ด้วย (ภาพประกอบ S9, A ถึง C) เมื่อนำมาประกอบเข้าด้วยกันข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับ circulating MRP8/14 สูงขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 และสัมพันธ์กับภาวะลิ่มเลือดอุดตัน การเจ็บป่วยวิกฤต ตลอดจนช่วงระยะเวลาที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล

การยับยั้ง P2Y₁₂ ช่วยลด platelet S100A8 และ S100A9 และลดการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด

ในขณะที่ผู้ป่วยโควิด 19 ยังคงมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน การเจ็บป่วยวิกฤต ตลอดจนการเสียชีวิต ทั้งที่มีและไม่มีการรักษาต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant therapy) (3) เราได้ทำการศึกษาผลกระทบของการรักษาต้านเกล็ดเลือด (antiplatelet therapy) ที่มีต่อ mRNA ของ platelet S100A8 และ S100A9 รวมทั้งต่อการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีเกล็ดเลือดเป็นตัวเร่ง กลุ่มของตัวควบคุม (control) ซึ่งเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับยา aspirin ($n = 63$) ทุก ๆ วัน วันละ 1 ครั้ง หรือยา ticagrelor ($n = 49$) ทุก ๆ วัน วันละ 2 ครั้งเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ (ตาราง S7) มีการเก็บตัวอย่างเลือดและสกัด RNA ของเกล็ดเลือดก่อนการให้ยารักษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐาน (baseline) และอีกครั้งหนึ่งหลังจากการรักษาผ่านไป 4 สัปดาห์ ในขณะที่ยา aspirin ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพประกอบ 6A) แต่ยา ticagrelor นำไปสู่การลดลงอย่างมีนัยสำคัญของการแสดงออกของ mRNA ทั้งของ platelet S100A8 และ S100A9 ($P < 0.0001$; ภาพประกอบ 6, B และ C) เพื่อที่จะประเมินว่าการรักษาต้านเกล็ดเลือด (antiplatelet therapy) สามารถจะหยุดยั้งผลกระทบที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบต่อเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดซึ่งมีเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลางได้หรือไม่ เราจึงได้ทำการ incubate เกล็ดเลือดที่ได้รับการเพาะแยกเชื้อกับยา aspirin ยาต้าน P2Y₁₂ (AZD1283) หรือกับยาด้าน glycoprotein IIb/IIIa (eptifibatide) จากการ incubate สิ่งที่เกิดเกล็ดเลือดปลดปล่อยออกมา (platelet releasate) ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างที่มีการใช้ยาด้านเกล็ดเลือดชนิดต่าง ๆ กันนี้พบว่ายาด้าน P2Y₁₂ ทำให้มีการลดการแสดงออกของยีนเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบลงได้มากที่สุด (ลดลง 29% สำหรับ IL6 ลดลง 51% สำหรับ IL8 และลดลง 32% สำหรับ CCL20; ภาพประกอบ 6D)



ภาพประกอบ 6. การยับยั้ง P2Y₁₂ ช่วยลดการแสดงออกของ platelet S100A8 และ S100A9 และลดการกระตุ้นเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่มีเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลาง

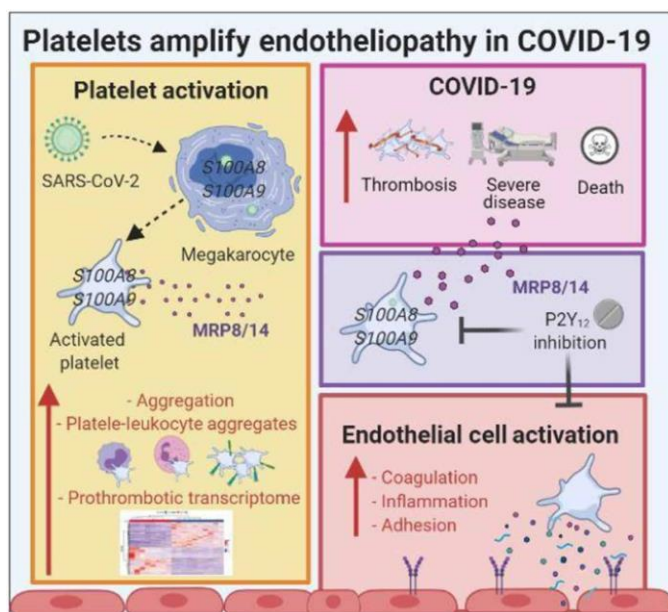
กลุ่ม (cohort) ผู้ป่วยได้รับ (A) ยา aspirin ทุก ๆ วันวันละครั้ง ($n = 63$) หรือ (B) ยา ticagrelor (90 mg) ทุก ๆ วันวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ($n = 49$) มีการเก็บตัวอย่างเลือดและการสกัด platelet RNA ก่อนเริ่มการศึกษาวิจัยและหลังจากการรักษาต้านเกล็ดเลือด (antiplatelet therapy) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ การพล็อตกราฟแสดงปริมาณการแสดงออกที่เป็นปกติ (normalized) ของ S100A8 และ S100A9 ตอนเริ่มต้น (baseline) และหลังจากการรักษาต้านเกล็ดเลือด (antiplatelet therapy) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ **** $P < 0.0001$ ตามที่วัดโดย paired t test (C) Forest plot ของ log fold change (LogFC) ระหว่าง การแสดงออกของ platelet S100A8 และ S100A9 ตอนเริ่มต้น (baseline) และระหว่างการติดตาม (follow-up) ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ยและช่วงความเชื่อมั่น 95% (D) การแสดงออกของ IL6, IL8, และ CCL20 ภายหลังจากที่เซลล์ผนังหลอดเลือดมีการรับสัมผัสติดต่อกับ platelet releasate ที่เกิดขึ้นในระหว่างที่มีการได้รับยา aspirin (1 mM), AZD1283 (1 μ M, P2Y₁₂ inhibitor), หรือ eptifibatide (18 μ M, glycoprotein IIb/IIIa inhibitor) เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงซึ่งเทียบกับเซลล์ที่ได้รับการ treat กับ platelet releasate เมื่อไม่มีการได้รับยาต้านเกล็ดเลือด $n = 6$ unique releasate donors ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM ที่แสดงซึ่งเทียบกับเซลล์ผนังหลอดเลือดที่ได้รับการ treat กับ platelet releasate ; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ โดย paired t test

การอภิปราย (DISCUSSION)

โรคโควิด 19 ระยะรุนแรงมีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับภาวะที่เกิดลิ่มเลือดอุดตันได้ง่ายกว่าปกติ (hypercoagulable state) และกับการตอบสนองที่เป็นการอักเสบที่แข็งแกร่ง (robust inflammatory response) ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีความเสี่ยงไปในทางที่จะเกิดอาการภาวะลิ่มเลือดอุดตันทั้งชนิด macro- และ microthrombotic events (34-38) การกระตุ้นในลักษณะที่เชื่อมประสานกันระหว่างการตอบสนองที่เป็นการอักเสบและที่ทำให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันได้รับการเรียกขานว่า “thromboinflammation” ระดับของ mediators ที่มีแนวโน้มเร่งการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันระยะเฉียบพลัน (prothrombotic acute phase mediators) ซึ่งได้แก่ fibrinogen, vWF, และ D-dimer มีการเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 ซึ่งมีส่วยเกี่ยวข้องกันกับเยื่อผนังหลอดเลือด เกิดเลือด ตลอดจนระบบการแข็งตัวของเลือดในฐานะที่เป็น mediators ที่มีความเป็นไปได้ในการเกิด thromboinflammation ในผู้ป่วยโควิด 19 มีการเชื่อว่าภาวะความผิดปกติของเยื่อผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ซึ่งเกิดตามมามีการเชื่อมโยงเกี่ยวข้องกับการอักเสบ ความผิดปกติของภูมิคุ้มกัน (immune dysregulation) ตลอดจนการเกิดลิ่มเลือด และเป็นตัวขับเคลื่อนให้เกิดผลทางคลินิกที่ไม่ดีในผู้ป่วยโควิด 19 (39, 40) ถึงแม้ว่าเป็นสิ่งที่น่าเชื่อได้ว่าเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) (12, 13) แต่จากหลักฐานที่ได้จากการทดลองเมื่อเร็ว ๆ นี้เป็นการสนับสนุนว่ามีกลไกการกระตุ้นโดยอ้อมที่เป็นตัวขับเคลื่อนให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดในผู้ป่วยโควิด 19 (14)

เกล็ดเลือดเป็นสิ่งที่ตอบสนองอันดับแรกสุดต่อการบาดเจ็บของหลอดเลือด และทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระบบภูมิคุ้มกันเข้ากับการเกิดลิ่มเลือด โดยผ่านทาง การกระตุ้นและการปลดปล่อย mediators ต่าง ๆ ที่เป็น hemostatic mediators และ inflammatory mediators เกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นจะหลั่ง host ของ mediators ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบในบริเวณแวดล้อมเล็ก ๆ เฉพาะที่ (local microenvironment) ซึ่งเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการทำให้เกิดการอักเสบและการยึดเกาะของเยื่อผนังหลอดเลือด (18, 19) เกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นซึ่งเพาะแยกเชื้อจากผู้ป่วยโรคที่มีการอักเสบ เช่น โรคแพ้ภูมิตัวเอง (systemic lupus erythematosus หรือ SLE) เอชไอวี และโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดฟิโนไทป์ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบ (16, 20, 21) ก่อนหน้านี้เราและผู้วิจัยคนอื่น ๆ ได้รายงานไว้ว่าโรคโควิด 19 มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันกับฟิโนไทป์ของเกล็ดเลือดที่ hyperactive (23, 24) ซึ่งมีลักษณะพิเศษคือ platelet activation markers ที่เพิ่มมากขึ้นและ transcriptome ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบและที่มีแนวโน้มเร่งการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน จากการเชื่อมโยงระหว่างเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นเข้ากับ microvasculature เราได้ศึกษาเพื่อที่จะหาว่า factors ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือดมีส่วนให้เกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ในกรณีของผู้ป่วยโควิดหรือไม่

การศึกษาของเราให้รายละเอียดของการที่เกล็ดเลือดที่ **hyperactive** จากผู้ป่วยโควิด 19 มีการปลดปล่อย **factors** ต่าง ๆ ซึ่งกระตุ้นให้เกิดเยื่อพองผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบและเกิดลิ่มเลือดได้ง่ายกว่าปกติได้อย่างไร (**ภาพประกอบ 7**) การเปลี่ยนแปลง **transcription** ในเซลล์เยื่อพองผนังหลอดเลือดมีความสัมพันธ์กันโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงของ **transcriptome** ในเกล็ดเลือดซึ่งเชื่อมโยงความแตกต่างที่พบใน **complementary cell types** เหล่านี้ จากการทำ **sequencing** เกล็ดเลือดที่ใช้ในการ **incubate** เซลล์เยื่อพองผนังหลอดเลือดพบชุดยีนเกล็ดเลือดจำนวน **523** ยีนที่มีความเชื่อมโยงสัมพันธ์กันอย่างสม่ำเสมอกับการเปลี่ยนแปลงของ **transcriptomic pathway** ในเซลล์เยื่อพองผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบ มีความเป็นไปได้ว่าชุดยีนนี้อาจจะเป็น **signature** ของเกล็ดเลือดผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีลักษณะพิเศษเป็นหนึ่งเดียวซึ่งควรที่จะได้มีการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต



ภาพประกอบ 7. กลไกที่เสนอ

ภาพรวมแผนภูมิของการเกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อพองผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่ได้รับการกระตุ้นจากเกล็ดเลือด

การตรวจคัดกรอง **candidate platelet genes** ซึ่งแสดงออกแตกต่างกันโดยปราศจากความลำเอียงนำไปสู่การระบุแยกแยะ **S100A8** และ **S100A9** รวมทั้งผลิตภัณฑ์โปรตีน คือ **MRP8/14** ในฐานะที่เป็น **candidate** ที่มีความเป็นไปได้ของภาวะความผิดปกติของเยื่อพองผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่มีเกล็ดเลือดเป็นสื่อกลาง **S100A8/A9 mRNA** ของเกล็ดเลือดและ **MRP8/14** จากเกล็ดเลือดมีการเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 และการแสดงออกตลอดจนการ **translation** มีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกกับการเปลี่ยนแปลงที่พบในวิถีการแข็งตัวของเลือดและการอักเสบของเซลล์เยื่อพองผนังหลอดเลือดตลอดจนการสร้าง **IL6** และ **IL8** ซึ่งเป็น **cytokines** ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบซึ่งควบคุมการแสดงออกของ **adhesion molecule** ของเซลล์เยื่อพองผนังหลอดเลือด (**41**) ในขณะที่ครั้งหนึ่ง **circulating plasma MRP8/14** ได้รับการพิจารณาว่าได้มาจาก **leukocyte** เท่านั้น (**42**) แต่เกล็ดเลือดและ **megakaryocytes** ก็เป็นแหล่งที่มาเพิ่มเติมสำหรับ **MRP8/14** (**31, 32, 43, 44**) ในขณะที่ระดับของ **MRP8/14** ใน **circulating plasma** เพียงอย่างเดียวมีการสหสัมพันธ์กับวิถีการแข็งตัวของเลือดและการอักเสบ

ของเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด แต่ระดับของ platelet *S100A8/A9* mRNA และ releasate MRP8/14 มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์ที่แน่นแฟ้นมากกว่ากับการทำหน้าที่ที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดโดยตรง ซึ่งทำให้น่าคิดถึงความสำคัญของ MRP8/14 จากเกล็ดเลือดที่มีต่อการทำหน้าที่ที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด การศึกษาวิจัยชิ้นนี้ของเราไม่ได้ตัดทิ้งสาเหตุประกอบอื่น ๆ ทั้งที่เป็น cellular และ noncellular contributors ของการเกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ในกรณีผู้ป่วยโควิด 19 ซึ่งอาจจะทำงานร่วมกันกับ MRP8/14 ยกตัวอย่างเช่น มีการรายงานเมื่อ

เร็ว ๆ นี้ว่า serum antiphospholipid (aPL) antibodies ในซีรัมของผู้ป่วยโควิด 19 กระตุ้นการแสดงออกของ adhesion molecule ต่อเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (45) การศึกษาวิจัยหลายชิ้นก่อนหน้านี้พบว่า aPL antibodies สนับสนุนให้เกิดการกระตุ้นเกร็ดเลือดรวมทั้งการปลดปล่อย MRP8/14 จากการกระตุ้นนั้นเข้าสู่บริเวณแวดล้อมเล็ก ๆ (microenvironment) นั้น ทำให้มีหลักฐานของกลไกเพิ่มเติมเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับสิ่งแวดล้อมการอักเสบเฉพาะที่ (local inflammatory environment) ในกรณีผู้ป่วยโควิด 19 ที่มีส่วนทำให้เกิดการทำหน้าที่ที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (32, 46)

เราพบว่าปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 กับ primary megakaryocytes กระตุ้นการแสดงออกของ *S100A8/A9* ซึ่งเป็นการค้นพบที่มี clinical implications โดยที่จากการสังเกตของเราพบว่า megakaryocytes จากผู้ป่วยโควิด 19 มีไวรัสซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ที่มีส่วนประกอบครบสมบูรณ์ (virions) (26) และข้อมูลจากการทำ single-cell sequencing มีการรายงานว่ามี up-regulation ของ *S100A9* ใน circulating megakaryocytes ในผู้ป่วยโควิด 19 (27) ที่น่าทึ่งก็คือว่า up-regulation ของ *S100A8/A9* ไม่มีการเกิดขึ้นหลังจากที่ megakaryocytes มีการรับสัมผัสกับเชื้อโคโรนาไวรัสที่เป็นสาเหตุของไข้หวัดธรรมดา (CoV-OC43) ซึ่งเป็นการเน้นย้ำให้มีความสำคัญว่าเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 สามารถเป็นสื่อกลางให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบต่อ megakaryocytes และเกล็ดเลือดได้โดยอิสระ ไม่เกี่ยวข้องกันกับกลไกทางอ้อม (เช่น การอักเสบของร่างกายทั้งระบบ) (47, 48) ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยของเราบ่งชี้ว่า

platelet *S100A8/A9* mRNA ที่เพิ่มมากขึ้นแปลว่ามี การปลดปล่อย platelet MRP8/14 ที่เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ด้วยเหตุนี้จึงบ่งบอกว่าปฏิกิริยาโดยตรงระหว่าง megakaryocytes กับเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นการเพิ่มปฏิกิริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบ MRP8/14 มีการเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอในเกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นและในเกล็ดเลือดที่เพาะแยกเชื้อจากผู้ป่วยโรคหลอดเลือดแดงส่วนปลายอุดตัน (peripheral artery disease) และโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายชนิดหลอดเลือดหัวใจอุดตันเฉียบพลัน (ST-elevation myocardial infarction) จากการทดลองในหลอดทดลองพบว่า MRP8/14 กระตุ้นการสร้าง platelet surface P-selectin (31) ซึ่งเป็น ligand หลักในปฏิกิริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด นอกจากนี้หนูทดลองที่ถูกฉีดเอทจาก MRP-14^{-/-} มีการแสดงออกของ P-selectin ที่ลดลงในการตอบสนองต่อคอลลาเจนและ arachidonic acid ซึ่งเป็นอิสระไม่เกี่ยวข้องกับการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด (44)

ลักษณะธรรมชาติของ platelet MRP8/14 ที่มีแนวโน้มเร่งการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันและมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการอักเสบได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาวิจัยหลายชิ้นซึ่งพบการแสดงออกของ *S100A8/A9* สำหรับ platelet transcript และมีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นของ plasma MRP8/14 รวมทั้งสามารถทำนายการเกิดภาวะการมีลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดแดง (atherothrombotic) ในอนาคต (31, 43) ระดับ MRP8/14 มีการเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) โรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเผาผลาญอาหาร (metabolic disease) ตลอดจนในภาวะการอักเสบต่าง ๆ รวมทั้งโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคแพ้ภูมิตัวเอง (SLE) และโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) (31, 43, 49–51) งานศึกษาวิจัยหลายชิ้นก่อนหน้านี้พบว่า MRP8/14 มีการเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 (52, 53) ในการศึกษาวิจัยนี้เราพบว่าการเพิ่มขึ้นของ mRNA ของ platelet *S100A8* และ *S100A9* ในผู้ป่วยโควิด 19 และการเพิ่มขึ้นที่สอดคล้องกันของ MRP8/14 ที่เกิดเลือดปลดปล่อยออกมา ซึ่งทั้งหมดนี้ล้วนมีสหสัมพันธ์กับ circulating MRP8/14 ในบรรดาผู้ป่วยโควิด 19 จำนวนทั้งสิ้น 291 รายที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลพบว่าระดับของ circulating MRP8/14 มีการเพิ่มสูงขึ้นในระหว่างที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล เมื่อวัดปริมาณตอนเริ่มต้น (baseline) MRP8/14 มีการสหสัมพันธ์กับการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน การเจ็บป่วยรุนแรง และช่วงระยะเวลาที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล ส่วนทางกับการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยของ MRP8/14 ในบรรดาผู้ป่วยที่เจ็บป่วยไม่รุนแรง และพบว่าการเพิ่มขึ้นสูงถึง 8 เท่าในผู้ป่วยโควิด 19 ที่เสียชีวิตในเวลาต่อมา

เมื่อเร็ว ๆ นี้ศักยภาพในการรักษาโดยการยับยั้ง MRP8/14 signaling ได้รับการแนะนำให้เป็นวิธีในการลดภาวะ thromboinflammation ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับโรคโควิด 19 (54) เพื่อให้เกิดความเข้าใจในศักยภาพทางคลินิกของสิ่งที่เราค้นพบ เราได้ทำการศึกษา (i) ผลกระทบของการรักษาด้านเกล็ดเลือดต่อ *S100A8/A9* platelet mRNA และ (ii) ผลกระทบของการรักษาด้านเกล็ดเลือดต่อการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นจากเกล็ดเลือดจากการทดลองในหลอดทดลอง ส่วนทางกับยา aspirin การ targeting P2Y₁₂ โดยใช้ยา ticagrelor ทำให้ platelet mRNA ลดลงสำหรับ *S100A8* และ *S100A9* จากการทดลองในหลอดทดลองพบว่าการยับยั้ง P2Y₁₂ เป็นการลดการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดที่มีเกร็ดเลือดเป็นสื่อกลางได้อย่างมีนัยสำคัญในกรณีผู้ป่วยโควิด 19 ความสามารถของยา aspirin ในการลดทอนปฏิกิริยาระหว่างเกร็ดเลือดกับเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดมีความชัดเจนน้อยกว่า ผลดีของการลดการปลดปล่อย platelet MRP8/14 โดยผ่านทาง targeting P2Y₁₂ ได้รับการสนับสนุนจากการศึกษาวิจัยในหนูทดลอง ซึ่งพบว่าการฉีดวัคซีน S100A9 มีผลในการต้านภาวะลิ่มเลือดอุดตันเทียบเท่ากับผลที่ได้จากการใช้ยา clopidogrel (55) นอกจากนี้แล้วจากการที่มีหลักฐานว่า P2Y₁₂ inhibitors ลดการปลดปล่อยปริมาณของ α-granule ที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบจากเกล็ดเลือด (56) รวมทั้งลดการจับตัวกันระหว่างเกล็ดเลือดกับ leukocyte (57) ผลที่เป็นประโยชน์ของวิธีนี้จึงได้รับการตั้งสมมติฐานว่ามีหลายแง่มุม โดยรวมแล้วข้อมูลเหล่านี้ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่าการยับยั้ง P2Y₁₂ จะลดการกระตุ้นเกล็ดเลือด ลด MRP8/14 ที่ปลดปล่อยจากเกล็ดเลือด และในที่สุดก็จะยับยั้งปฏิกิริยาอาการของเกล็ดเลือดและการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด ตลอดจนทำให้ผลทางคลินิกที่เชื่อมโยงกับ thromboinflammation จากโควิด 19 มีการปรับปรุงดีขึ้น ในขณะที่ข้อมูลที่ได้จากการสังเกตทำให้น่าเชื่อถือได้ว่ายา aspirin มีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลที่เป็นประโยชน์ต่อผลทางคลินิกในผู้ป่วยโรคโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล

(58, 59) แต่จากการศึกษาวิจัยเชิงทดลองแบบสุ่มซึ่งมีอาสาสมัครเข้าร่วมจำนวนมากเกือบ 15,000 คนพบว่า aspirin ไม่ได้ช่วยปรับปรุงผลลัพธ์หลัก (primary end point) คืออัตราการเสียชีวิตใน 28 วัน (28-day mortality) (60) ผลทางคลินิกของกลยุทธ์การใช้ P2Y₁₂ inhibitor กำลังได้รับการศึกษาวิจัยใน ACTIV4a (NCT04505774)

การศึกษาวิจัยของเราอธิบายว่าเกล็ดเลือดที่ได้รับการเพาะแยกเชื้อจากผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลมีการปลดปล่อย MRP8/14 ในปริมาณที่มีนัยสำคัญซึ่งสามารถที่จะมีปฏิกริยาในลักษณะ paracrine ต่อเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดที่อยู่ใกล้เคียงซึ่งสนับสนุนให้เกิดภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ได้อย่างไร การศึกษาวิจัยครั้งนี้ของเรามีข้อจำกัดหลายอย่าง ได้แก่ (i) ขนาดกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทำ sequencing ที่ค่อนข้างน้อย (ii) แหล่งที่มาของ plasma MRP8/14 ไม่สามารถเชื่อได้อย่างแน่นอนว่ามาจากเกล็ดเลือดและอาจจะเกิดจากเซลล์อื่น ๆ รวมทั้ง neutrophils ด้วย (iii) ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่ได้รับการกระตุ้นจาก MRP8/14 จากการสังเกตมีการเกิดขึ้นในบริบทของไวรัส (viral settings)

อื่น ๆ หรือไม่ (iv) การตรวจวินิจฉัยทางคลินิกของการเกิดลิ่มเลือด (thrombosis) ในระหว่างการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลอาจจะมีการประเมินต่ำกว่าความเป็นจริงเพราะว่าการทำ imaging studies มีจำกัด เนื่องจากความกังวลในการแพร่กระจายการติดเชื้อหรือความเสี่ยงต่อการเสียชีวิต และ (v) ผลของการรักษาต้านเกล็ดเลือดที่มีต่อการกระตุ้นเซลล์เยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดซึ่งได้รับการกระตุ้นจากเกล็ดเลือดกรณีผู้ป่วยโควิด 19 ยังไม่เคยมีการศึกษาวิจัยมาก่อน การศึกษาวิจัยในอนาคตจะมีเป้าหมายในการจัดการกับข้อจำกัดเหล่านี้ เพื่อให้มีความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับปฏิกริยาระหว่างเกล็ดเลือดกับเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 และความเจ็บป่วยจากไวรัสอื่น ๆ รวมทั้งกับเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด ขณะนี้โครงการการศึกษาวิจัยเชิงทดลองซึ่งเป็นโครงการที่ทำพร้อมกันหลายประเทศกำลังดำเนินการอยู่ ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยผลกระทบของการยับยั้ง P2Y₁₂ ที่มีต่อผลทางคลินิกของผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล (NCT04505774)

กล่าวโดยสรุปเราได้ทำให้เห็นถึงบทบาทใหม่สำหรับภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่ได้รับการกระตุ้นจากเกล็ดเลือดในกรณีผู้ป่วยโควิด 19 ฟิโนไทป์เกล็ดเลือดที่ได้รับการกระตุ้นซึ่งสังเกตพบในผู้ป่วยโควิด 19 มีการกระตุ้นเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือดที่มีแนวโน้มทำให้เกิดการอักเสบและการทำหน้าที่ผิดปกติอย่างสม่ำเสมอ MRP8/14 จากเกล็ดเลือดมีการเพิ่มสูงขึ้นในผู้ป่วยโควิด 19 และกระตุ้นให้เกิดการบาดเจ็บของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด Circulating MRP8/14 มีศักยภาพในการทำหน้าที่เป็น biomarker ที่มีประโยชน์สำหรับการเกิดลิ่มเลือดและความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยที่ติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 การรักษาที่มุ่งไปที่เกล็ดเลือด (platelet-directed therapy) โดยเฉพาะ P2Y₁₂ inhibitors อาจจะเป็นตัวแทนของการรักษาที่ดึงดูดความสนใจเป็นการเฉพาะเนื่องจากมีผลต่อ platelet S100A8/A9 และต่อภาวะความผิดปกติของเยื่อบุโพรงผนังหลอดเลือด (endotheliopathy) ที่ได้รับการกระตุ้นจากเกล็ดเลือด (ภาพประกอบ 7)

เครื่องมือและวิธีการ (MATERIALS AND METHODS)

ประชากร (Population)

Clinical cohort no. 1: ผู้ป่วยโควิด 19 ที่เข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลกลุ่มหนึ่งได้รับการรับสมัครจากเครือข่ายสุขภาพ Langone Health แห่ง NYU ในระหว่างวันที่ 12 มีนาคม ถึง 2 พฤษภาคม พ.ศ. 2563 การติดเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 ได้รับการยืนยันจากการตรวจวิธี RT-PCR ตามมาตรฐานในปัจจุบัน ผู้ป่วยโควิด 19 และผู้ที่อยู่ในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ป่วยเป็นโรคโควิด 19 ทุกคนได้รับการรับสมัครภายใต้โครงการการศึกษาวิจัยซึ่งได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมโครงการวิจัยของเครือข่ายสุขภาพ Langone Health แห่ง NYU อาสาสมัครผู้เข้าร่วมแต่ละคน หรือตัวแทนผู้ซึ่งได้รับมอบอำนาจตามกฎหมายได้ให้คำยินยอมซึ่งได้รับการบอกกล่าวเป็นลายลักษณ์อักษรสำหรับการลงทะเบียนเข้าร่วมโครงการการศึกษาวิจัยซึ่งเป็นไปตามปฏิญญาเฮลซิงกิ เกณฑ์ในการรับเข้าสำหรับอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโควิด 19 ได้แก่ จะต้องมียุมากกว่า 18 ปี อยู่ในช่วงการเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาล มีผลการตรวจหาเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 เป็นบวก รวมถึงมีการให้คำยินยอมซึ่งได้รับการบอกกล่าว อาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วยโควิด 19 ได้รับการติดตามอาการจนกระทั่งออกจากโรงพยาบาลหรือเสียชีวิต

Clinical cohort no. 2: อาสาสมัครที่เป็นผู้ที่มีสุขภาพดีได้รับการรับสมัครจาก the Duke Clinical Research Unit (DCRU; Durham, NC) (61) โดยที่ได้รับความยินยอมซึ่งได้รับการบอกกล่าวเป็นลายลักษณ์อักษรจากอาสาสมัครแต่ละคน และโครงการการศึกษาวิจัยได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมโครงการวิจัยของ Duke University Health System อาสาสมัครเหล่านี้ (อายุระหว่าง 30 ถึง 75 ปี) เป็นผู้ที่ไม่มีประวัติเกี่ยวกับภาวะเลือดออกผิดปกติ ภาวะเลือดออกในทางเดินอาหาร ภาวะเลือดออกในกะโหลกศีรษะ หรือทราบว่าเป็นแผลในกระเพาะอาหารมาก่อน (ไม่มีบันทึกการแก้ปัญหา) ไม่มีภาวะของการที่ตับได้รับความเสียหายรุนแรงที่ทราบมาก่อน ไม่ได้เข้ารับการผ่าตัดภายในช่วง 6 เดือนก่อนหน้านั้น ไม่เคยเข้ารับการผ่าตัดลดขนาดกระเพาะอาหารมาก่อน ซึ่งอาจจะไปรบกวนการดูดซึมยาที่ได้รับจากโครงการการศึกษาวิจัย รวมทั้งไม่เคยมีอาการแพ้ยา aspirin อาสาสมัครไม่สามารถใช้ยาใด ๆ นอกเหนือจากยาเม็ดคุมกำเนิดชนิดรับประทาน ไม่สามารถสูบบุหรี่หรือผลิตภัณฑ์ที่มีสารนิโคตินหรือสารใด ๆ ที่ผิดกฎหมาย รวมทั้งไม่สามารถตั้งครก (ที่ทราบมาก่อน) หรืออยู่ระหว่างให้นมบุตร อาสาสมัครที่ใช้ยา aspirin อยู่จะต้องมีช่วงระยะเวลาว่างเว้น (washout period) 4 สัปดาห์เป็นอย่างน้อย และต้องได้รับการอนุมัติเห็นชอบจากแพทย์ประจำตัวก่อนการลงทะเบียนเข้าร่วมในโครงการการศึกษาวิจัย

ปฏิกิริยาอาการของเกล็ดเลือด (Platelet activity)

การใช้ flow cytometry สำหรับเกล็ดเลือด

Circulating MPA, platelet P-selectin, และ platelet CD40 ได้รับการแยกแยะวินิจฉัยในเลือดที่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดตามที่ได้อธิบายมาก่อนหน้านี้ (62) รายละเอียดวิธีการอยู่ในส่วนของเครื่องมือเพิ่มเติม (Supplementary Materials)

การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Platelet aggregation)

การเกาะกลุ่มได้รับการวัดค่าโดยใช้วิธี light transmission aggregometry (Helena AggRAM, Beaumont, TX) ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะการกวนตามที่ได้อธิบายมาก่อนหน้านี้ (31) การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้รับการประเมินตามการตอบสนองต่อ 0.1 μ M adenosine diphosphate (ADP), 0.1 μ M epinephrine, และ phosphate-buffered saline และรายงานเป็นการเกาะกลุ่มที่ 180 s

การสร้าง platelet releasate

ตัวอย่างเลือดที่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดถูกพักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีหลังจากการเจาะเลือด สารสกัดพลาสมาที่มีความเข้มข้นของเกล็ดเลือดสูงกว่าระดับปกติ (platelet-rich plasma (PRP)) ได้จากการปั่นแยก (centrifuge) เลือดที่ 200g เป็นเวลา 10 นาที สารสกัดพลาสมาที่มีความเข้มข้นของเกล็ดเลือดสูงกว่าระดับปกติ (PRP) ถูกใส่ลงในสารละลายซึ่งมีความเข้มข้น 1:10 (ปริมาตร/ปริมาตร) ของ ACD-A [tris-sodium citrate (25 g/liter), glucose (20 g/liter), และ citric acid (14 g/liter)] และปั่นที่ 1000g เป็นเวลา 10 นาที platelet pellet ถูกล้างในสารละลาย Tyrode's buffer (137 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM glucose, และ 10 mM Hepes, ค่า pH 7.4) และ 1 μ M prostaglandin E₁ (Sigma-Aldrich) ก่อนนำไปปั่นแยกที่ 1000g เป็นเวลา 10 นาที และนำมาทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้ง (resuspension) ที่ความเข้มข้น 500,000/ μ l ในสารละลาย Tyrode's buffer ซึ่งมี 2 mM CaCl₂, และนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้น factors ที่เกล็ดเลือดหลั่งออกมาถูกเก็บรวบรวมโดยการ isolate ส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) หลังจากปั่นแยกที่ 1000g เป็นเวลา 3 นาที Platelet supernatants ได้รับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนนำไปใช้ Protocol ในการสร้าง platelet releasate โดยที่มี platelet inhibitors อยู่ในส่วนของเครื่องมือเพิ่มเติม (Supplementary Materials)

RNA sequencing

รายละเอียดเกี่ยวกับการศึกษาลำดับอาร์เอ็นเอของเกล็ดเลือดและเยื่อผนังหลอดเลือดสำหรับกลุ่มอาสาสมัครที่ NYU และที่ Duke รวมทั้งการวิเคราะห์ชีวสารสนเทศ (bioinformatic analyses) ที่สอดคล้องกันอยู่ในส่วนข้อมูลเพิ่มเติม (Supplementary Materials)

การวัดปริมาณของ plasma MRP8/14

การเก็บตัวอย่างพลาสมา

ตัวอย่างเลือดได้รับการจัดเก็บในหลอด PST tubes (BD Diagnostics) และพลาสมาได้รับการจัดเก็บโดยการปั่นแยก (centrifugation) และเก็บที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา

5 วัน หลังจากนั้นจะได้รับการแบ่ง (aliquoted) และเก็บไว้นาน ๆ ในระยะยาวที่อุณหภูมิ -80°C ระดับพลาสมาของ MRP8/14 ได้รับการวัดปริมาณโดยวิธี LEGENDplex bead-based immunoassay (BioLegend, ผลิตภัณฑ์หมายเลข 740891) ตามที่ทางบริษัทผู้ผลิตแนะนำ

การผลิต cytokine ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด

ความเข้มข้นของ IL6 และ IL8 ในส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatants) ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กได้รับการวัดปริมาณโดยวิธี LEGENDplex bead-based immunoassay (BioLegend, ผลิตภัณฑ์หมายเลข 740907) ตามที่ทางบริษัทผู้ผลิตแนะนำ

การเพาะเลี้ยง primary megakaryocyte

เซลล์ CD34^{+} ของตัวอย่างเลือดจากการเจาะที่ปลายนิ้วมือซึ่งได้รับการทำให้บริสุทธิ์แล้วได้รับจากศูนย์โลหิตแห่งมหานครนิวยอร์ก เซลล์ได้รับการเพาะเลี้ยงใน StemSpan SFEM II (เทคโนโลยีสเต็มเซลล์) ซึ่งมีการเสริมด้วย stem cell factor (100 ng/ml; ระบบการวิจัยและพัฒนา) และ thrombopoietin (TPO; 50 ng/ml; ระบบการวิจัยและพัฒนา) เป็นระยะเวลา 5 วัน เซลล์ได้รับการเพาะเลี้ยงโดยใช้ TPO (50 ng/ml) เฉพาะจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 11 เท่านั้น Megakaryocytes ได้รับการ incubate กับเชื้อ SARS-CoV-2 หรือกับเชื้อ CoV-OC43 ในวันที่ 11 รายละเอียดเกี่ยวกับเชื้อ SARS-CoV-2 หรือเชื้อ CoV-OC43 อยู่ในส่วนข้อมูลเพิ่มเติม (Supplementary Materials)

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

เราใช้การทดสอบชนิด Student's t test หรือการทดสอบชนิด Mann-Whitney U test ในการวิเคราะห์ตัวแปรต่อเนื่องตามความเหมาะสม ความแตกต่างระหว่างตัวแปรจัดกลุ่มได้รับการคำนวณโดยใช้การทดสอบชนิด chi-square หรือการทดสอบชนิด Fisher's exact test ตามความเหมาะสม การวิเคราะห์สหสัมพันธ์กระทำโดยวิธี Spearman rank correlation method มีการแปลงข้อมูลโดยวิธีการ Logarithmic transformation ตามความเหมาะสม มีการใช้การถดถอยโลจิสติกส์ในการประเมินความสัมพันธ์กันระหว่าง MRP8/14 กับผลที่ได้ ผลที่ได้แสดงเป็นค่า ORs พร้อมด้วย ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% ค่า P values ชนิดสองทางที่ต่ำกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ การวิเคราะห์ทางสถิติทำโดยใช้ R version 3.5.2