

บทความพิเศษ

Molecular Biology of Megakaryocytes and Clinical Applications

พลภัทร โรจน์นครินทร์*

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



Megakaryocyte เป็นเซลล์ที่น่าสนใจที่สุดในร่างกายมนุษย์ เพราะนอกจากจะสร้างเกร็ดเลือดซึ่งทำหน้าที่ในการห้ามเลือด และมีบทบาทในโรคเลือดอุดตันแล้วยังมีลักษณะพิเศษในการเจริญเป็นตัวแก่ที่ไม่เหมือนเซลล์อื่นใดในร่างกาย ได้แก่การเพิ่มปริมาณ DNA โดยไม่เพิ่มจำนวนเซลล์ทำให้ปริมาณ DNA เพิ่มจากค่าปกติ (2N) เป็น 4N, 8N และอาจมากถึง 64 เท่าของเซลล์อื่นๆ (128N) เรียกว่า endomitosis การที่มีปริมาณ DNA ที่มากนี้เองทำให้เซลล์สามารถเพิ่มขนาด จนเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่เป็น 10 เท่าของเซลล์เม็ดเลือดอื่นๆ (หรือมีปริมาตรเป็น 1,000 เท่าของเซลล์อื่น) หลังจากนั้นจะมีการจัดเรียงตัวของ cytoskeleton ในเซลล์เพื่อสร้างเกร็ดเลือดหลายพันเซลล์จาก megakaryocyte หนึ่งเซลล์ ดังนั้นความเข้าใจในการเจริญของ megakaryocyte นอกจากจะนำไปสู่ความเข้าใจในพยาธิสภาพและการรักษาภาวะที่มีความผิดปกติในการสร้างเกร็ดเลือดแล้วยังให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับชีววิทยาระดับเซลล์ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น เซลล์มะเร็งที่มีปริมาณ DNA มากกว่าปกติ เป็นต้น

Thrombopoietin (TPO) และ

Mpl (Thrombopoietin receptor)

คำศัพท์ thrombopoietin (TPO) ได้มีการบัญญัติขึ้นตั้งแต่ปี 1958 สำหรับฮอร์โมนที่ควบคุมการสร้างเกร็ดเลือด¹ แต่นักวิทยาศาสตร์ใช้เวลาเกือบ 40 ปีในการ

ค้นหา TPO นี้ การค้นพบที่นำไปสู่ TPO เริ่มจากรายงานที่ดูจะไม่เกี่ยวกับการสร้างเกร็ดเลือดเลย โดยในปี 1986 มีการค้นพบ oncogene จากไวรัสคือ Mpl ซึ่งทำให้เกิด myeloproliferative leukemia (Mpl) ในหนู² ในปี 1992 มีการค้นพบ Mpl homolog ในคนและพบว่าเป็น cytokine receptor แต่ ligand ของ Mpl ยังไม่ทราบ³ จนกระทั่ง 2 ปีต่อมาในปี 1994 นักวิทยาศาสตร์ 3 กลุ่มได้ clone ligand ของ Mpl ได้พร้อมกัน และพบว่ามันคือ TPO⁴⁶

ความสำคัญของ TPO และ TPO receptor (Mpl) ต่อ megakaryocyte (MK) ได้รับการพิสูจน์ in vivo โดยการสร้างหนูที่ยีน TPO หรือ Mpl ถูกทำลาย (knockout) หนูที่ขาด TPO หรือ Mpl จะมีเกร็ดเลือดและ MK ต่ำกว่าปกติอย่างมาก นอกจากนี้หนูเหล่านี้ยังมีจำนวน stem cell และ progenitor cell ของทุก lineage ลดต่ำลงแสดงถึงความสำคัญของ TPO ต่อ survival และ/หรือการแบ่งเซลล์ของ stem cell in vivo⁷ ดังนั้น TPO นอกจากจะใช้กระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือดแล้วยังอาจใช้ป้องกัน stem cell ถูกทำลายจากรังสีรักษาและเคมีบำบัด ซึ่งมีหลักฐานในหนูทดลอง พบว่าถ้าให้ TPO ก่อนการฉายรังสีเพื่อการปลูกถ่ายไขกระดูก พบว่าสามารถเร่งการฟื้นตัวของไขกระดูกได้¹⁰ แม้จะมีหลักฐานคลินิกพบว่า TPO สามารถเร่งการฟื้นตัวของเกร็ดเลือดซึ่งต่ำลงหลังจากได้รับยาเคมีบำบัดสำหรับโรคมะเร็ง¹¹ การ

ใช้ TPO กลับยังไม่ค่อยแพร่หลาย เนื่องจากการศึกษาการใช้ TPO ที่มี การเปลี่ยนแปลงในโมเลกุล (โดยการตัดส่วน C terminus และใส่หมู่ polyethylene glycol) เรียกว่า MGDF (megakaryocyte growth and development factor) ในอาสาสมัคร เพื่อเพิ่มจำนวนเกร็ดเลือดในการบริจาคเกร็ดเลือด พบว่าบางรายเกิดแอนติบอดีต่อ MGDF ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ TPO ในร่างกาย (cross-reaction) ทำให้เกิดภาวะเกร็ดเลือดต่ำจากการขาด TPO อย่างไรก็ดี ยังไม่มีผู้ใดทราบว่า การใช้ TPO โมเลกุลที่เหมือนธรรมชาติโดยไม่ได้ดัดแปลงจะทำให้เกิดแอนติบอดีแบบเดียวกับ MGDF หรือไม่

TPO ในหลอดทดลองสามารถเพิ่ม survival ของ stem cell¹² และการทดลองกับเซลล์จากสายสะดือเด็ก ซึ่งมี stem cell อยู่มาก การให้ TPO ร่วมกับ Flt3 ligand สามารถเพิ่มขยายปริมาณ primitive progenitor cells ได้อย่างมาก¹³ นอกจากนี้การทดลองในเซลล์ไขกระดูกหนูที่ใส่ลงกับ stromal cell และ TPO ก็สามารถเพิ่มขยาย primitive progenitor cell ได้เช่นเดียวกัน¹⁴ TPO จึงอาจมีบทบาทในการใช้เพื่อเพิ่มขยาย stem cell ในหลอดทดลองเพื่อนำไปปลูกถ่ายไขกระดูกในการที่มี stem cell ไม่พอเพียง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานว่า TPO ร่วมกับ cytokine อื่นๆ จะสามารถเพิ่มจำนวน stem cell จากไขกระดูกมนุษย์ในหลอดทดลองได้ จึงต้องมีการศึกษาต่อไป

ในทางคลินิกมีโรค congenital amegakaryocytic thrombocytopenia ซึ่งพบในเด็ก โดยจะมีเกร็ดเลือดต่ำมากแต่กำเนิดร่วมกับมี megakaryocyte ลดลงอย่างมากในไขกระดูก โดยถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal recessive ผู้ป่วยเหล่านี้ประมาณ 50% จะพบว่ามี mutation ของยีน Mpl ทั้ง 2 alleles ทำให้ไม่สามารถตอบสนองต่อ TPO ได้¹⁵ ซึ่งพิสูจน์ความสำคัญของ TPO และ Mpl ในคน นอกจากนี้เมื่อผู้ป่วยอายุ 4-5 ขวบโรคจะดำเนินกลายเป็น aplastic anemia คือมีเม็ดเลือดต่ำทั้ง 3 series ซึ่งแสดงว่า TPO และ Mpl มี

ความสำคัญต่อ stem cell ในคนด้วย

ผู้ป่วย essential thrombocythemia (ET) จะพบมีเกร็ดเลือดสูงโดยไม่ทราบสาเหตุ ในสมัยก่อนจะจัดผู้ป่วยทั้งหมดอยู่ในกลุ่ม myeloproliferative disease ซึ่งมีการเพิ่มจำนวนของ monoclonal hematopoietic cells ต่อมาเมื่อการศึกษา clonality พัฒนามากขึ้นพบว่าผู้ป่วย ET มีหลายประเภทปะปนกันมีทั้ง monoclonal และ polyclonal hematopoiesis¹⁶ ผู้ป่วยที่มีเกร็ดเลือดเพิ่มขึ้นแบบ polyclonal จึงไม่จัดอยู่ในกลุ่ม myeloproliferative disease และอัตราการเสี่ยงต่อ thrombosis อาจไม่สูงเท่าในกลุ่ม monoclonal¹⁷ แต่อัตราการเสี่ยงต่อ thrombosis ในผู้ป่วยแต่ละกลุ่มของ ET คงต้องมีการศึกษาต่อไป ผู้ป่วย ET บางรายที่เป็น polyclonal hematopoiesis จะมีประวัติเกร็ดเลือดสูงในครอบครัวร่วมด้วย (familial ET) โดยจะพบมีความผิดปกติในส่วน 5'untranslated region ของยีน TPO ทำให้มีการสร้าง TPO มากผิดปกติ¹⁸ และระดับของ TPO ในเลือดสูงขึ้น โดยเชื่อว่าเกิดจากการเพิ่มอัตราการ translation จาก messenger RNA ของ TPO¹⁹ ผู้ป่วยเหล่านี้ในทางทฤษฎีไม่ควรมียาต้านการแข็งตัวของเลือดสูง เนื่องจากเป็น polyclonal hematopoiesis แต่อัตราการเสี่ยงของ thrombosis คงต้องมีการศึกษาต่อไปเนื่องจาก familial ET เป็นโรคที่พบไม่บ่อย

มีรายงานพบว่าในผู้ป่วย myeloproliferative disease ได้แก่ polycythemia vera,²⁰ agnogenic myeloid metaplasia และ essential thrombocythemia จะมี Mpl receptor บนเกร็ดเลือดลดลง ซึ่งจะต่างจากภาวะเม็ดเลือดสูงจากสาเหตุอื่น เช่น reactive thrombocytosis หรือ secondary erythrocytosis ซึ่งจะมี Mpl บนเกร็ดเลือดในปริมาณปกติ²¹ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าความแตกต่างนี้ ไม่ชัดเจนพอที่จะนำมาวินิจฉัยแยกโรค myeloproliferative กับ reactive ในทางคลินิก นอกจากนี้ยังพบว่า Mpl บนผิวเซลล์จะลดลงใน myelodysplastic syndrome (MDS) ด้วย^{21,23} ทำให้เชื่อว่าการ

ลดลงของ Mpl เป็นการเปลี่ยนแปลงที่ไม่จำเพาะเจาะจง และอาจไม่ได้มีบทบาทที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในโรคเหล่านี้ สาเหตุและผลที่ตามมาของ Mpl ที่ลดลงบนผิวเซลล์ในโรคเหล่านี้ ยังไม่ทราบแน่นอน

แหล่งที่สร้าง TPO ที่สำคัญในร่างกายคือตับ โดยอัตราการหลั่ง TPO จะค่อนข้างคงที่ แต่การควบคุมความเข้มข้นของ TPO ในเลือดคือ การที่เกร็ดเลือดและ MK จะดูดซับ TPO ในเลือดด้วย Mpl ดังนั้นเมื่อมีเกร็ดเลือดและ MK ต่ำลง การดูดซับ TPO จะลดลง ทำให้มีระดับ TPO สูงขึ้นในเลือด และในทางกลับกัน TPO จะต่ำลงถ้าเกร็ดเลือดและ MK มากขึ้น เป็นการควบคุมปริมาณเกร็ดเลือดให้อยู่ในภาวะสมดุล^{24,25,26} กลไกนี้สามารถใช้อธิบายการที่โรค Immune thrombocytopenic purpura (ITP) ที่มีเกร็ดเลือดต่ำ แต่ระดับ TPO ไม่สูงเท่าที่ควร เพราะ MK ที่เพิ่มขึ้นในไขกระดูกจะดูดซับ TPO ไว้^{27,28} การให้ TPO จึงอาจจะมีที่ใช้นี้ในผู้ป่วย ITP เหล่านี้ นอกจากนี้การที่ TPO สร้างที่ตับ จะมีผู้ป่วยโรคตับวายบางรายจะมีเกร็ดเลือดต่ำ เนื่องจากขาด TPO²⁹ และการให้ TPO ก็อาจมีประโยชน์ในผู้ป่วยเหล่านี้เช่นกัน อย่างไรก็ตามต้องคำนึงไว้ด้วยว่าผู้ป่วยโรคตับจะมีเกร็ดเลือดต่ำได้จากสาเหตุอื่นด้วย เช่น hypersplenism และ disseminated intravascular coagulation เป็นต้น

นอกจากที่ตับแล้ว stromal cell ในไขกระดูก ก็สามารถสร้าง TPO ได้ด้วย โดยอัตราการสร้างของ TPO จาก stromal cell นี้ จะแปรผกผันกับจำนวน MK ในไขกระดูกซึ่งต่างจากตับที่ไม่เปลี่ยนอัตราสร้าง^{31,33} ความสำคัญของ TPO ที่หลังจาก stromal cell ต่อการควบคุมระดับเกร็ดเลือดเทียบกับความสำคัญของ TPO จากตับคงต้องมีการศึกษาต่อไป

Thrombopoietin signal transduction

เนื่องจากพัฒนาการของ MK จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องอาศัย TPO มากกระตุ้น การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ TPO ในระดับโมเลกุลย่อมจะทำให้เราเข้าใจกลไกการ

เจริญของ MK ในระดับโมเลกุลได้ด้วย

การจับกับ receptor ของ TPO จะคล้ายกับ erythropoietin และ G-CSF กล่าวคือ 1 โมเลกุลของ TPO จะจับกับ 2 โมเลกุลของ Mpl การที่ TPO ดึงเอา Mpl 2 โมเลกุลมาอยู่ใกล้กัน (dimerization) ในระยะและมุมที่เหมาะสมนี้จะเกิดการกระตุ้นของ receptor ขึ้น การทำงานของ Mpl ก็จะคล้ายกับของ growth factor receptor อื่นๆ คือ มีการกระตุ้นให้มีการใส่หมู่ฟอสเฟตเข้าไปในกรดอะมิโน tyrosine ของโปรตีน (tyrosine phosphorylation) โดยเอนไซม์ที่เรียกว่า tyrosine kinase แต่ Mpl จะไม่คุณสมบัติเป็น kinase ในตัวมันเอง โดยจะมี tyrosine kinase ชื่อว่า JAK2 จับกับ Mpl และจะใส่หมู่ฟอสเฟตเข้าไปในโปรตีนต่างๆ เมื่อ JAK2 ที่เกาะอยู่บน Mpl 2 โมเลกุลเข้ามาใกล้กันจากการจับกับ TPO^{34,35}

การศึกษามากมายหลายการศึกษาพบว่า Mpl เมื่อจับกับ TPO จะกระตุ้นโปรตีนถ่ายทอดสัญญาณ (signaling molecules) มากมายหลายชนิด เช่น STAT,³⁶ mitogen activated protein kinases (MAPKs),³⁷ Gab, IRS, PI3K,³⁸ protein kinase C, SHP2 ฯลฯ หน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้จะเหลื่อมล้ำกัน แม้โมเลกุลใดโมเลกุลหนึ่งถูกทำลายให้เสียหายไป โมเลกุลอื่นก็อาจทำงานชดเชยได้ ซึ่งเป็นผลดีต่อร่างกายที่จะรักษา การสร้างเกร็ดเลือดให้อยู่ในภาวะปกติ แม้กลไกการถ่ายทอดสัญญาณจะเสียไปบางส่วน³⁹ อย่างไรก็ตามการสร้างเกร็ดเลือดในเวลาที่ยังต้องการเป็นอย่างมาก เช่น หลังได้รับยาเคมีบำบัด หรือภาวะที่เกร็ดเลือดถูกทำลายจากแอนติบอดี โมเลกุลทุกตัวจะต้องทำงานพร้อมกันเพื่อให้ได้ผลสูงสุด การทดลองในหนูหลายรายงานสนับสนุนความคิดนี้ โดยหนูที่มี signaling pathway ของ TPO ถูกทำลายบางส่วนจะมีระดับเกร็ดเลือดปกติ แต่ถ้าได้รับเคมีบำบัดจะมีเกร็ดเลือดต่ำอยู่นานกว่าหนูปกติ และตายจากภาวะเลือดออก^{40,42}

จากการที่เราทราบว่า TPO ออกฤทธิ์โดยดึง Mpl 2

โมเลกุลเข้ามาใกล้กัน (dimerization) จึงมีผู้ใช้โมเลกุลขนาดเล็ก เช่น polypeptide เพื่อจับกับ Mpl 2 โมเลกุลเข้าหากันเพื่อกระตุ้นการเจริญของ MK⁴³

ดังที่กล่าวไปแล้วว่า การใช้โมเลกุลขนาดใหญ่ที่คล้าย TPO ในคน (MGDF) อาจเกิดแอนติบอดีต่อ endogenous TPO ได้⁴⁴ แต่ peptide เหล่านี้จะมีโครงสร้างที่ต่างจาก TPO อย่างสิ้นเชิง โอกาสเกิดแอนติบอดีต่อ TPO จึงน้อยมาก ขณะนี้เริ่มมีการใช้โมเลกุลเหล่านี้ในสัตว์ทดลองแล้ว⁴⁵

การใช้ยาที่มีผลต่อการทำงานของ TPO และ Mpl ก็เป็นอีกจุดหนึ่งที่น่าสนใจทางคลินิก มีหลายอย่างที่น่าสนใจเกี่ยวกับการทำงานของ receptor อื่นเช่น การต้าน tumor necrosis factor receptor ในการรักษาโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และยาต้าน vascular endothelial growth factor receptor ในการรักษาโรคมะเร็งต่างๆ นอกจากนี้การยับยั้งการถ่ายทอดสัญญาณจาก receptor ไปสู่เซลล์ เช่น การใช้ STI 571 เพื่อยับยั้ง bcr-abl kinase ในโรค chronic myeloid leukemia การศึกษาถึง signal transduction โดยละเอียดจึงอาจนำไปสู่การค้นพบยาใหม่ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของ TPO ในอนาคต

เนื่องจากกลไก signal transduction ของ TPO ส่วนใหญ่ที่มีการศึกษาล้วนแต่คล้ายคลึงกัน กลไก signal transduction ของ cytokine อื่นๆ การให้ยาที่มีผลต่อกลไกเหล่านี้ จึงมีโอกาสเกิดผลข้างเคียงได้มาก เนื่องจาก signal transduction ของ cytokine หรือ growth factor อื่นๆ จะได้รับผลกระทบจากยาไปด้วย คณะผู้วิจัยจึงพยายามที่จะหาไกลของ Mpl signal transduction ที่จำเพาะต่อ MK โดยการหาโมเลกุลจาก cDNA library ของ megakaryocyte ที่จับกับ Mpl โดยวิธี yeast two hybrid ซึ่งเป็นวิธีที่จะหาโมเลกุลที่จับกับ Mpl จากหลายหมื่นยีนส์ที่แสดงออกโดย MK คณะผู้วิจัยพบว่า P selectin ซึ่งเป็นโมเลกุลที่พบใน MK และ endothelial cell จับกับ Mpl ทั้งใน yeast cell และในหลอดทดลอง เนื่องจาก MK เป็นเซลล์ชนิดเดียว

ที่มี Mpl และ P selectin อยู่ในปริมาณมาก การจับกันของ Mpl และ P selectin จึงน่าจะจำเพาะสำหรับ Mpl และต่างจาก growth factor receptor อื่นๆ เป็นที่น่าสนใจว่า MK ที่ไม่มี P selectin (ซึ่งได้มาจากหนูที่ยีนส์ P selectin ถูกทำลาย) จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TPO ได้เท่ากับ MK ปกติ⁴⁶ กลไก signal transduction ระหว่าง Mpl และ P selectin คงต้องมีการศึกษาต่อไป

Endomitosis

Endomitosis เป็นปรากฏการณ์ที่น่าสนใจมากของ megakaryocyte เพราะเซลล์ทั่วไปจะมีการสร้าง DNA จาก 2N เป็น 4N (S phase) 1 ครั้ง สลับกับการแบ่งเซลล์จาก 1 เป็น 2 (M phase) 1 ครั้งเสมอ แต่ใน MK จะมีการเพิ่มปริมาณ DNA จาก 2N เป็น 4N, 8N, 16N, 32N, 64N และอาจสูงถึง 128N โดยไม่มีการแบ่งเซลล์ การศึกษาโดยละเอียดพบว่า M phase เกิดขึ้นแต่ไม่สมบูรณ์ กล่าวคือ nuclear membrane มีการสลายตัว โครโมโซมหดสั้น และมาเรียงตัวกัน (metaphase) โครโมโซมมีการแยกตัวห่างกันเล็กน้อย (anaphase A) แต่แทนที่โครโมโซม จะแยกห่างต่อไป (anaphase B) กลับหยุดอยู่แค่นั้น nuclear membrane กลับมีขึ้นมาใหม่และล้อมโครโมโซมทั้งหมดไว้ในนิวเคลียสเดียวโดยไม่มี cytokinesis เกิดขึ้น⁴⁷

กลไกที่ทำให้ไม่มี anaphase B นี้ยังไม่ทราบแน่นอน มีผู้เสนอว่า MK ในระยะ M phase จะขาดโปรตีนที่ทำหน้าที่ใน anaphase ได้แก่โปรตีนในกลุ่ม Aurora kinase⁴⁸ แต่การศึกษาต่อมากลับพบว่า โปรตีนในกลุ่มนี้ไม่ลดลงใน MK ที่กำลังอยู่ในช่วง endomitosis⁴⁹ ดังนั้นกลไกของ MK endomitosis คงต้องมีการศึกษาต่อไป

การที่ MK มีการเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากกว่าเซลล์อื่นนี้ เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์อย่างมาก จนเซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกว่า 10 เท่า ของเซลล์เม็ดเลือดอื่นๆ หลังจากนั้นเซลล์จะทำการสร้างเกร็ดเลือด โดยจะสามารถสร้างหลายพันเกร็ดเลือด ต่อ MK

1 เซลล์ในทางคลินิกจะพบว่า endomitosis ของ MK จะสัมพันธ์กับความสามารถในการสร้างเกร็ดเลือด มีรายงานผู้ป่วย familial thrombocytopenia ซึ่งเป็นภาวะที่มีเกร็ดเลือดต่ำพันธุกรรมที่ถ่ายทอดโดย autosomal recessive ที่พบว่า endomitosis ของ MK ลดลง ทำให้ MK สร้างเกร็ดเลือดได้น้อย โดยพบความผิดปกติของยีนส์บนโครโมโซมคู่ที่ 10 ซึ่งยีนส์ที่มี mutation ในโรคนี้ยังไม่ทราบแน่นอน⁵⁰

นอกจากนี้ผู้ป่วยที่มี atherosclerosis และเบาหวานจะพบว่า MK มีปริมาณ DNA มากกว่าคนปกติ⁵¹⁻⁵³ โดยเชื่อว่า MK ที่มี endomitosis มากกว่าปกตินี้จะสามารถสร้างเกร็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งจะทำหน้าที่ได้ดีกว่าเกร็ดเลือดปกติ (hyperreactivity)^{54,55} และอาจเป็นสาเหตุของ thromboembolism ในผู้ป่วยเหล่านี้ ดังนั้นการเข้าใจกลไกของ endomitosis อาจนำไปสู่การรักษาที่ยับยั้งกระบวนการนี้เพื่อป้องกันภาวะ thromboembolism ในผู้ป่วยเหล่านั้น

การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ DNA ใน MK ยังพบได้ในกลุ่มโรค myeloproliferative disease โดยจะพบ endomitosis มากขึ้นในโรค essential thrombocythemia และ polycythemia vera แต่ endomitosis จะลดลงในโรค chronic myeloid leukemia⁵⁶ ซึ่งจะสัมพันธ์กับการที่เรพบ MK ขนาดใหญ่ในโรค ET และ PV แต่ใน CML จะมี MK ขนาดเล็ก ความสัมพันธ์ของ MK endomitosis ต่อพยาธิสภาพของโรคเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่นอน

Proplatelet formation

เมื่อ MK ในหลอดเลือดเจริญเต็มที่ เซลล์จะยื่นกิ่งก้านออกจากตัวเซลล์ โดยรอบกิ่งก้านเหล่านี้จะประกอบด้วยเกร็ดเลือดหลายๆ เม็ดมาต่อๆ กันเรียกว่า proplatelet ก่อนจะแตกเป็นเกร็ดเลือด⁵⁷ ปรากฏการณ์สร้าง proplatelet นี้สามารถพบได้จากภาพ electron micrography ของชิ้นเนื้อของไขกระดูก โดยจะพบกิ่งก้าน proplatelet นี้ออกจาก MK ในไขกระดูกผ่าน

ผนังของ sinusoid เข้าไปในหลอดเลือด แล้วปล่อยเกร็ดเลือดเข้าสู่กระแสเลือด^{58,59} แสดงว่า proplatelet formation เกิดขึ้นจริงในร่างกาย ไม่ใช่เกิดในหลอดทดลองเท่านั้น นอกจากนี้สัตว์ทดลองที่ถูกทำให้การสร้าง proplatelet เสียไป จะมีจำนวนเกร็ดเลือดต่ำลง⁶⁰ แสดงว่าการสร้างเกร็ดเลือดแบบนี้จะมีความสำคัญทางคลินิก

เกร็ดเลือดเป็นเซลล์ที่มีโครงสร้างของ cytoskeleton ที่ชัดเจน คือมี tubulin เป็นวงอยู่รอบเซลล์ทำให้มีรูปร่างคล้ายจาน และเป็นเซลล์ที่มี actin อยู่มาก การจัดเรียงโครงสร้างของ tubulin และ actin ภายใน MK จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นในการสร้างเกร็ดเลือด การศึกษาเร็วนี้พบว่า MK มีการรวมกลุ่มกันของ actin ในเซลล์ก่อนการสร้างเกร็ดเลือด⁶¹ จากนั้นการยื่น proplatelet ออกจาก MK จะอาศัย tubulin ยื่นออกจากเซลล์โดย proplatelet เหล่านี้จะมีการโค้งงอและแตกกิ่งก้าน เมื่อมีการหักมุมจะเกิดเป็นเกร็ดเลือดขึ้น⁶²

การศึกษาในหลอดเลือดพบว่า TPO มีความจำเป็นที่จะทำให้ MK มีความสมบูรณ์คือมี endomitosis และมีขนาดเซลล์ใหญ่พร้อมที่จะสร้างเกร็ดเลือด แต่การสร้าง proplatelet เอง ซึ่งเป็นเป็นขั้นสุดท้ายของการเจริญของ MK จะไม่สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วย TPO และอาจต้องการปัจจัยอื่นในการกระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือดนี้ มีการศึกษาพบว่า extracellular matrix protein^{63,65} และพลาสมา^{57,61,66} จะสามารถกระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือดจาก MK ในหลอดเลือด ซึ่งน่าจะมีความสำคัญในการสร้างเกร็ดเลือดในร่างกายด้วย เนื่องจากการสร้าง proplatelet จะเกิดจาก MK ที่อยู่ชิดกับหลอดเลือดดังกล่าวแล้ว extracellular matrix protein จาก basement membrane ของ sinusoidal endothelium หรือสารจาก plasma จึงอาจกระตุ้นให้ MK ที่อยู่ใกล้เคียงยื่น proplatelet เข้าไปในหลอดเลือดและปล่อยเกร็ดเลือดเข้าไปในหลอดเลือดได้ มีผู้พยายามจะหาสารใน extracellular matrix และพลาสมาที่เป็นตัวกระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือดแล้วพบว่า serglycin ใน extracellular matrix⁶⁵ และ

thrombin antithrombin complex (TAT) ร่วมกับ high density lipoprotein (HDL) ในพลาสมาเป็นตัวสำคัญที่กระตุ้นการสร้างเกร็ดเลือด⁶⁷ TAT ที่สูงขึ้นในภาวะ disseminated intravascular coagulation (DIC) อาจเป็นตัวกระตุ้นให้มีการปล่อยเกร็ดเลือดออกจาก MK ในภาวะนี้

กลไกระดับโมเลกุลของการสร้าง proplatelet ก็เป็นเรื่องที่น่าสนใจแก่การศึกษา เพราะมีบางโรคเช่น myelodysplastic syndrome ที่มีการสร้างเกร็ดเลือดลดลงโดยที่จำนวน MK อาจจะปกติ นอกจากนี้ผู้ป่วย immune thrombocytopenic purpura นอกจากจะมีเกร็ดเลือดต่ำจากการทำลายเกร็ดเลือดโดยแอนติบอดีแล้ว ยังพบว่าแอนติบอดีเหล่านี้ยังอาจยับยั้งการสร้างเกร็ดเลือด ทำให้เกร็ดเลือดต่ำลงอีกเป็นกลไกที่ 268 ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้ศึกษากลไกระดับโมเลกุลของการสร้าง proplatelet พบว่า protein kinase C alpha เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อกระบวนการนี้ โดยโปรตีนนี้จะจับกับ actin cytoskeleton ขณะที่มีการสร้างเกร็ดเลือด และการใช้สารยับยั้ง protein kinase C alpha จะพบว่าสามารถยับยั้งการสร้างเกร็ดเลือดได้⁶¹ protein kinase C จะมีหลายชนิด เช่น alpha, beta, gamma, epsilon เป็นต้น การใช้ยาที่เจาะจงยับยั้งเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งจะทำให้ได้ผลตามต้องการ โดยน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้อง เป็นที่น่าสนใจว่าได้มีการใช้ protein kinase C alpha antisense oligonucleotide เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้อย่างเฉพาะเจาะจง ในการรักษา มะเร็งพบว่าผลข้างเคียงที่สำคัญคือ ภาวะเกร็ดเลือดต่ำ^{70,71} ซึ่งจะเกิดจากการยับยั้งการสร้างเกร็ดเลือดหรือไม่ คงต้องมีการศึกษาต่อไป

นอกจากนี้ transcription factor NF-E2 ซึ่งพบครั้งแรกใน erythroid ก็พบว่ามีสำคัญต่อการสร้าง proplatelet โดยพบว่าหนูที่ขาด NF-E2 (knock-out) จะมีเกร็ดเลือดต่ำมาก และ MK ของหนูเหล่านี้ไม่สามารถสร้าง proplatelet ในหลอดทดลองได้⁶⁰ การ

ศึกษาต่อไปโดยการศึกษาการแสดงออกของยีนส์ในเซลล์ที่ขาด NF-E2 เทียบกับเซลล์ปกติ (subtraction analysis) จะพบว่า MK ที่ไม่มี NF-E2 จะขาด $\beta 1$ tubulin ซึ่งเป็น tubulin ที่จำเพาะสำหรับ เซลล์เม็ดเลือด และมีมากใน MK ปกติ การสร้างหนูที่ขาด $\beta 1$ tubulin ต่อมาพบว่ามีการเลือดต่ำกว่าปกติ และมีการสร้าง proplatelet ลดลง แสดงถึงความสำคัญของ tubulin ชนิดนี้ในการสร้างของเกร็ดเลือด⁷¹

ดังได้กล่าวไปแล้วว่า เกร็ดเลือดที่ใหญ่ขึ้น จะสัมพันธ์กับการเกิด thrombosis โดยเมื่อมีการทำลายของเกร็ดเลือดเกิดขึ้น เช่นจากแอนติบอดี เกร็ดเลือดที่สร้างออกมาใหม่ จะมีขนาดใหญ่เป็น reactive platelet ซึ่งจะทำงานได้ดีกว่าเกร็ดเลือดธรรมดา ถ้าเราทราบกลไกของการสร้างเกร็ดเลือด และควบคุมขนาดของเกร็ดเลือดที่สร้างออกมา อาจทำให้เราสามารถควบคุมภาวะ thrombosis ได้ในอนาคต

โดยสรุป MK เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญต่อทั้งภาวะเลือดออกและ thrombosis ขณะนี้เราเริ่มเข้าใจถึงกลไกการพัฒนาของ MK มากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งอาจนำไปสู่การรักษาโรคต่างๆ เหล่านี้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocytopenic sera. *Acta Haematol* 1958;20:350-5.
2. Wendling F, Varlet P, Charon M, Tambourin P. MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* 1986;149:242-6.
3. Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5640-4.
4. De Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA. Stimulation of megakaryo-

- cytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369:533-8.
5. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369:565-8.
 6. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-24.
 7. Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 1996;87:2162-70.
 8. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1195-200.
 9. Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL. Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* 1998;92:4-10.
 10. Fibbe WE, Heemskerk DP, Laterveer L, Pruijt JF, Foster D, Kaushansky K, Willemze R. Accelerated reconstitution of platelets and erythrocytes after syngeneic transplantation of bone marrow cells derived from thrombopoietin pretreated donor mice. *Blood* 1995;86:3308-13.
 11. Fanucchi M, Glaspy J, Crawford J, Garst J, Figlin R, Sheridan W, Menchaca D, Tomita D, Ozer H, Harker L. Effects of polyethylene glycol-conjugated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on platelet counts after chemotherapy for lung cancer. *N Engl J Med* 1997;336:404-9.
 12. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, Kaushansky K. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;87:4998-5005.
 13. Piacibello W, Sanavio F, Garetto L, Severino A, Bergandi D, Ferrario J, Fagioli F, Berger M, Aglietta M. Extensive amplification and self-renewal of human primitive hematopoietic stem cells from cord blood. *Blood* 1997;89:2644-53.
 14. Yagi M, Ritchie KA, Sitnicka E, Storey C, Roth GJ, Bartelmez S. Sustained ex vivo expansion of hematopoietic stem cells mediated by thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:8126-31.
 15. Ballmaier M, Germeshausen M, Schulze H, Cherkaoui K, Lang S, Gaudig A, Krukemeier S, Eilers M, Strauss G, Welte K. c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood* 2001;97:139-46.
 16. Harrison CN, Gale RE, Machin SJ, Linch DC. A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood* 1999;93:417-24.
 17. Chiusolo P, La Barbera EO, Laurenti L, Piccirillo N, Sora F, Giordano G, Urbano R, Mazzucconi MG, De Stefano V, Leone G, Sica S. Clonal hemopoiesis and risk of thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol* 2001;29:670-6.
 18. Kondo T, Okabe M, Sanada M, Kurosawa M, Suzuki S, Kobayashi M, Hosokawa M, Asaka M. Familial essential thrombocythemia associated with one-base deletion in the 5'-untranslated region of the thrombopoietin gene. *Blood* 1998;92:1091-6.
 19. Ghilardi N, Skoda RC. A single-base deletion in the thrombopoietin (TPO) gene causes familial essential thrombocythemia through a mechanism of more efficient translation of TPO mRNA. *Blood* 1999;94:1480-2.
 20. Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 1998;338:572-80.
 21. Yoon SY, Li CY, Tefferi A. Megakaryocyte c-Mpl expression in chronic myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome: immunoperoxidase staining patterns and clinical correlates. *Eur J Haematol* 2000;65:170-4.

22. Harrison CN, Gale RE, Pezella F, Mire-Sluis A, MacHin SJ, Linch DC. Platelet c-mpl expression is dysregulated in patients with essential thrombocythaemia but this is not of diagnostic value. *Br J Haematol* 1999; 107:139-47.
23. Tamura H, Ogata K, Luo S, Nakamura K, Yokose N, Dan K, Tohyama K, Yoshida Y, Hamaguchi H, Sakamaki H, Kuwaki T, Tahara T, Kato T, Nomura T. Plasma thrombopoietin (TPO) levels and expression of TPO receptor on platelets in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998;103:778-84.
24. Nagata Y, Shozaki Y, Nagahisa H, Nagasawa T, Abe T, Todokoro K. Serum thrombopoietin level is not regulated by transcription but by the total counts of both megakaryocytes and platelets during thrombocytopenia and thrombocytosis. *Thromb Haemost* 1997;77:808-14.
25. Yang C, Li YC, Kuter DJ. The physiological response of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to thrombocytopenia in the rat. *Br J Haematol* 1999;105:478-85.
26. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, Meng G, Young NS, Dunbar CE, Shulman NR. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996;87:4068-71.
27. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, Tahara T, Kato T, Tadokoro S, Shiraga M, Honda S, Kanakura Y, Matsuzawa Y. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1996;93:704-6.
28. Ichikawa N, Ishida F, Shimodaira S, Tahara T, Kato T, Kitano K. Regulation of serum thrombopoietin levels by platelets and megakaryocytes in patients with aplastic anaemia and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1996;76:156-60.
29. Martin TG 3rd, Somberg KA, Meng YG, Cohen RL, Heid CA, de Sauvage FJ, Shuman MA. Thrombopoietin levels in patients with cirrhosis before and after orthotopic liver transplantation. *Ann Intern Med* 1997; 127:285-8.
30. Peck-Radosavljevic M, Wichlas M, Zacherl J, Stiegler G, Stohlawetz P, Fuchsjager M, Kreil A, Metz-Schimmerl S, Panzer S, Steininger R, Muhlbacher F, Ferenci P, Pidlich J, Gangl A. Thrombopoietin induces rapid resolution of thrombocytopenia after orthotopic liver transplantation through increased platelet production. *Blood* 2000;95:795-801.
31. McCarty JM, Sprugel KH, Fox NE, Sabath DE, Kaushansky K. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* 1995;86:3668-75.
32. Guerriero A, Worford L, Holland HK, Guo GR, Sheehan K, Waller EK. Thrombopoietin is synthesized by bone marrow stromal cells. *Blood* 1997;90:3444-55.
33. Hirayama Y, Sakamaki S, Matsunaga T, Kuga T, Kuroda H, Kusakabe T, Sasaki K, Fujikawa K, Kato J, Kogawa K, Koyama R, Niitsu Y. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells. *Blood* 1998;92:46-52.
34. Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem* 1995;270: 4979-82.
35. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem* 1999;274:13480-4.
36. Drachman JG, Sabath DF, Fox NE, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes. *Blood* 1997;89:483-92.
37. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood* 1999;94:1273-82.
38. Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem* 2001;276:2494-502.
39. Rojnuckarin P, Miyakawa Y, Fox NE, Deou J, Daum G, Kaushansky K. The Roles of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase C ζ for Thrombopoietin-

- induced Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Primary Murine Megakaryocytes. *J Biol Chem* 2001;276:41014-22.
40. Kirito K, Osawa M, Shimizu R, Oda A, Nakajima K, Morita H, Yamamoto M, Ozawa K, Komatsu N. Functional role of STAT3 in vivo megakaryopoiesis. *Blood* 2000;96:538a.
 41. Luoh SM, Stefanich E, Solar G, Steinmetz H, Lipari T, Pestina TI, Jackson CW, de Sauvage FJ. Role of the distal half of the c-Mpl intracellular domain in control of platelet production by thrombopoietin in vivo. *Mol Cell Biol* 2000;20:507-15.
 42. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998;93:841-50.
 43. Cwirla SE, Balasubramanian P, Duffin DJ, Wagstrom CR, Gates CM, Singer SC, Davis AM, Tansik RL, Mattheakis LC, Boytos CM, Schatz PJ, Baccanari DP, Wrighton NC, Barrett RW, Dower WJ. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. *Science* 1997;276:1696-9.
 44. Li J, Yang C, Xia Y, Bertino A, Glaspy J, Roberts M, Kuter DJ. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* 2001;98:3241-8.
 45. Case BC, Hauck ML, Yeager RL, Simkins AH, de Serres M, Schmith VD, Dillberger JE, Page RL. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of GW 395058, a peptide agonist of the thrombopoietin receptor, in the dog, a large-animal model of chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Stem Cells* 2000;18:360-5.
 46. Rojnuckarin P, Fox NE, Lin NC, Kaushansky K. P-selectin Interacts with c-Mpl and Augments Thrombopoietin (TPO)-induced Megakaryocyte (MK) Differentiation. (Submitted for publication)
 47. Nagata Y, Muro Y, Todokoro K. Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol* 1997;139:449-57.
 48. Kawasaki A, Matsumura I, Miyagawa Ji, Ezoe S, Tanaka H, Terada Y, Tatsuka M, Machii T, Miyazaki H, Furukawa Y, Kanakura Y. Downregulation of an AIM-1 kinase couples with megakaryocytic polyploidization of human hematopoietic cells. *J Cell Biol* 2001;152:275-87.
 49. Amy E. Geddis, Nancy Lin, Kenneth Kaushansky. Endomitotic Megakaryocytes (MKs) Express the Anaphase Proteins Survivin and AIM-1/STK-1 and They Are Localized to the Spindle and Kinetochore. (manuscript in preparation).
 50. Drachman JG, Jarvik GP, Mehaffey MG. Autosomal dominant thrombocytopenia: incomplete megakaryocyte differentiation and linkage to human chromosome 10. *Blood* 2000;96:118-25.
 51. Trowbridge EA, Slater DN, Kishk YT, Woodcock BW, Martin JF. Platelet production in myocardial infarction and sudden cardiac death. *Thromb Haemost* 1984;52:167-71.
 52. Bath PM, Gladwin AM, Carden N, Martin JF. Megakaryocyte DNA content is increased in patients with coronary artery atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 1994;28:1348-52.
 53. Brown AS, Hong Y, de Belder A, Beacon H, Beeso J, Sherwood R, Edmonds M, Martin JF, Erusalimsky JD. Megakaryocyte ploidy and platelet changes in human diabetes and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:802-7.
 54. Martin JF, Trowbridge EA, Salmon G, Plumb J. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. *Thromb Res* 1983;32:443-60.
 55. Kristensen SD, Bath PM, Martin JF. Differences in bleeding time, aspirin sensitivity and adrenaline between acute myocardial infarction and unstable angina. *Cardiovasc Res* 1990;24:19-23.
 56. Baatout S, Chatelain B, Staquet P, Symann M, Chatelain C. Endomitotic index of megakaryocytes measured by flow cytometry helps to diagnose hematological disorders with abnormal platelet counts. *Anticancer Res* 1998;18:3347-53.

57. Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC, Hunt P. Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995;85:402-13.
58. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976;145:183-205.
59. Radley JM, Scurfield G. The mechanism of platelet release. *Blood* 1980;56:996-9.
60. Lecine P, Villeval JL, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani RA. Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood* 1998;92:1608-16.
61. Rojnuckarin P, Kaushansky K. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood* 2001;97:154-61.
62. Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999;147:1299-312.
63. Topp KS, Tablin F, Levin J. Culture of isolated bovine megakaryocytes on reconstituted basement membrane matrix leads to proplatelet process formation. *Blood* 1990;76:912-24.
64. Leven RM, Tablin F. Extracellular matrix stimulation of guinea pig megakaryocyte proplatelet formation in vitro is mediated through the vitronectin receptor. *Exp Hematol* 1992;20:1316-22.
65. Hunt P, Hokom MM, Hornkohl A, Wiemann B, Rohde MF, Arakawa T. The effect of the platelet-derived glycosaminoglycan serglycin on in vitro proplatelet-like process formation. *Exp Hematol* 1993;21:1295-304.
66. Leven RM, Yee MK. Megakaryocyte morphogenesis stimulated in vitro by whole and partially fractionated thrombocytopenic plasma: a model system for the study of platelet formation. *Blood* 1987;69:1046-52.
67. Ishida Y, Yano K, Ito T, Shigematsu H, Sasaki K, Kondo S, Kuriya S. Purification of proplatelet formation (PPF) stimulating factor: thrombin/antithrombin III complex stimulates PPF of megakaryocytes in vitro and platelet production in vivo. *Thromb Haemost* 2001;85:349-55.
68. Takahashi R, Sekine N, Nakatake T. Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. *Blood* 1999;93:1951-8.
69. Nemunaitis J, Holmlund JT, Kraynak M, Richards D, Bruce J, Ognoskie N, Kwoh TJ, Geary R, Dorr A, Von Hoff D, Eckhardt SG. Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C-alpha, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:3586-95.
70. Yuen AR, Halsey J, Fisher GA, Holmlund JT, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A, Sikic BI. Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:3357-63.
71. Lecine P, Italiano JE Jr, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 2000;96:1366-73.