

บทความทั่วไป

สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของผนังเกล็ดเลือด

Platelet morphology and structural profile of platelet plasma membrane

ปริญานถ วงศ์จันทร์*

บทนำ

ในภาวะปกติร่างกายมีเกล็ดเลือดอยู่ประมาณ 140,000-400,000 เซลล์/ลบ.มม. จำนวนเกล็ดเลือดแปรผกผันกับปริมาตรเฉลี่ยของเกล็ดเลือด (mean platelet volume, MPV) หน้าที่สำคัญที่สุดของเกล็ดเลือดคือการห้ามเลือด เกล็ดเลือดมีอายุเฉลี่ยประมาณ 10 วัน ในระบบไหลเวียนโลหิต และถูกทำลายโดย reticuloendothelial system (RE system) เกล็ดเลือดเป็นส่วน cytoplasm ของ megakaryocyte ไม่มีนิวเคลียส จึงสามารถสังเคราะห์โปรตีนได้น้อยมาก¹ แต่เกล็ดเลือดสะสมสารประกอบและโมเลกุลหลายชนิดที่มีบทบาทต่อการแข็งตัวของเลือด (hemostasis) การสลายลิ่มเลือด (fibrinolysis) และการหายของบาดแผล (wound healing) อย่างไรก็ตามการที่เกล็ดเลือดสามารถหลั่งโมเลกุลเหล่านี้ได้ต้องได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกซึ่งทำงานเป็นระบบ และยังอาศัยการมีปฏิสัมพันธ์กับเซลล์อื่นด้วย เช่น ผนังหลอดเลือด ผ่านโมเลกุลบนผิวเซลล์ ดังนั้นการเรียนรู้รูปร่าง โครงสร้างของเกล็ดเลือดจึงเป็นสิ่งสำคัญ ทำให้เข้าใจหน้าที่และบทบาทของเกล็ดเลือดและโมเลกุลต่างๆ ที่หลังจากเกล็ดเลือดเอง เพราะเมื่อเกล็ดเลือดทำงานผิดปกติจะมีผลทำให้เกิดปัญหาเลือดออกง่าย หรือถ้าทำงานมากเกินไปหรือมีจำนวนเกล็ดเลือดมากเกินไป จะทำให้เกิดความผิดปกติในทางตรงข้ามคือการอุดตันของหลอดเลือดและโรคของหลอดเลือดเป็นต้น

สัณฐานวิทยาและโครงสร้างของเกล็ดเลือด (Morphology and structure of platelet)

เกล็ดเลือดมีลักษณะ discoid และ biconvex ย้อมติดสีเทาเงิน และมี granules ติดสีม่วงแดงเมื่อย้อมด้วย Wright stain มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5-2.5 micron หรือประมาณ 1/3 – 1/4 ของขนาดเม็ดเลือดแดง ปริมาตรประมาณ 5-7 ลูกบาศก์ไมครอน ขนาดและความหนาแน่นของเกล็ดเลือดขึ้นกับจำนวน granule ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างหลากหลาย (heterogenous)² และมีทฤษฎีที่อธิบายถึงที่มาเกี่ยวกับความหลากหลายในเรื่องขนาดของเกล็ดเลือด 2 ทฤษฎี ได้แก่

ทฤษฎีที่ 1 เชื่อว่าเกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่เป็นตัวอ่อน ส่วนพวกที่มีขนาดเล็กเป็นเกล็ดเลือดที่มีอายุแก่กว่า เกล็ดเลือดขนาดใหญ่นี้สร้างจาก 32n megakaryocyte ดังนั้นเกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ จึงทำงานได้ดีกว่า และมักพบติดอยู่ในม้าม³ จะพบมากขึ้นในภาวะที่ความต้องการเกล็ดเลือดสูง หรือมี turn over rate สูงในกระแสเลือด

ทฤษฎีที่ 2 เกิดขึ้นภายหลังและได้รับการยอมรับมากกว่า กล่าวว่าเกล็ดเลือดถูกสร้างให้มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่เริ่มต้น เพื่อให้ทำหน้าที่ต่างกัน เกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่ถูกสร้างจาก 4n และ 8n megakaryocyte เกล็ดเลือดประเภทนี้มีขนาดใหญ่⁴ ความหนาแน่นสูง

* แขนงวิชาวิทยาศาสตร์การธนาคารเลือด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

(dense platelet) จำนวน granule, dense body และ mitochondria ภายในมากกว่า ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าเกล็ดเลือดที่มีขนาดใหญ่จะมี mass และ membrane surface มากกว่า มีบทบาทเกี่ยวข้องกับผนังหลอดเลือดมากกว่าด้วย อีกทั้งยังไม่เกี่ยวข้องว่าจะเป็นตัวอ่อนหรือตัวแก่ พวกที่สองมีขนาดเล็ก สร้างจาก 16n และ 32n megakaryocyte⁵ เกล็ดเลือดแบบที่สองนี้มีน้ำหนักรเบา แต่มี open canalicular system (OCS) จำนวนมากกว่า จึงทำหน้าที่จับกับสิ่งแปลกปลอมต่างๆ รวมทั้งมีบทบาทต่อการสร้าง prostaglandins ได้ดีกว่า

โครงสร้างของเกล็ดเลือด

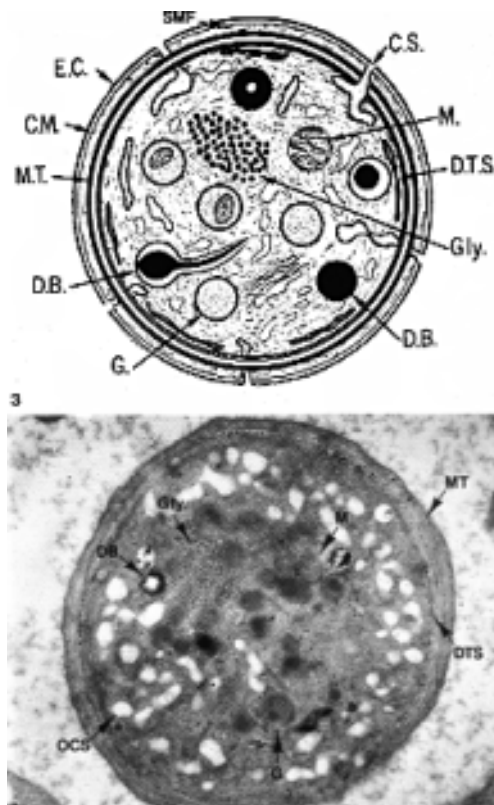
แบ่งเป็น 4 ส่วนโดยความสัมพันธ์ของลักษณะหน้าที่และโครงสร้างทางชีวเคมี ดังนี้ (รูปที่ 1)

1. **Peripheral zone** เป็น membrane ของเกล็ดเลือดและผนังของ Open canalicular system (OCS) ที่อยู่บริเวณผิว membrane

2. **Sol-gel zone** (Hyalomere) เป็นส่วนเนื้อ (เดิมคือ cytoplasm ของ megakaryocyte) รวมกับ contractile system

3. **Organelle zone** (Granulomere) ประกอบด้วย granule ชนิดต่างๆ mitochondria และ glycogen ซึ่งใช้เป็นแหล่งกำเนิดพลังงานภายในเกล็ดเลือด

4. **Membrane system** ประกอบด้วย dense tubular system (DTS) และ Open canalicular system (OCS) ที่เชื่อมต่อกับ membrane ซึ่งเรียกว่า surface-connected OCS



รูปที่ 1 สันฐานวิทยาของเกล็ดเลือด

Peripheral zone

เนื่องจากชั้นนอกสุดมีส่วนของ OCS ประกอบอยู่ด้วย จึงทำให้ผิวของเกล็ดเลือดมีลักษณะเป็นรูมุ่มอยู่ทั่วไป ผิวของเกล็ดเลือดบริเวณนอกสุดนี้ประกอบด้วย sialic acid จำนวนมากเช่นเดียวกับที่พบบนผิวเม็ดเลือดแดง หรือผนังหลอดเลือด จึงทำให้มีประจุเป็นลบสูง เกล็ดเลือดจึงอยู่เป็นอิสระไม่เกาะติดกับเซลล์ใดๆ หรือผนังหลอดเลือดในภาวะปกติ peripheral zone ยังแบ่งออกเป็น 3 ชั้นดังนี้

1. Exterior coat (หรือ Glycocalyx) ประกอบด้วยโมเลกุลที่มีหน้าที่และบทบาทสำคัญหลายชนิดได้แก่ glycoprotein, glycolipid, mucopolysaccharides และ plasma protein ที่ถูกดูดซับไว้จากกระแสเลือด⁶ โมเลกุลที่สำคัญที่สุดคือ glycoprotein มีหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะของ adhesion molecules หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะของเกล็ดเลือดกับผนังหลอดเลือดที่ฉีกขาด (adhesion) และ/หรือยึดเกาะกันเอง (aggregation)

2. Unit membrane มีลักษณะเป็น trilaminar unit กล่าวคือเป็น lipid bilayer เหมือนที่พบในผิวเมมเบรนทั่วไปคือประกอบด้วย phospholipids สองชั้นที่มี cholesterol, glycolipid และ glycoprotein แทรกอยู่ การจัดเรียงตัวของ unit membrane มีความเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลบนผิวเกล็ดเลือดและการเกิดกระบวนการสำคัญหลายอย่าง เช่นการส่งผ่านสัญญาณจากภายนอกเข้าสู่เซลล์และมีผลให้เกิดการหลั่งสารตัวกลางหลายชนิด⁷ การมีส่วนร่วมในกระบวนการแข็งตัวของเลือด และการรักษา ionic gradient ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์

3. Submembrane area ประกอบด้วยโครงสร้าง cytoskeleton network อยู่ใต้ผิวเมมเบรน โดยทำหน้าที่ร่วมกับ microtubule ช่วยในการรักษารูปร่างของเกล็ดเลือด และบางส่วนยังยึดกับ cytoplasmic tail ของ glycoprotein ผ่าน actin binding protein และ spectrin⁸ ดังนั้นจึงมีหน้าที่ในการนำส่งสัญญาณจากตัวรับจำเพาะบนผิวเมมเบรนสู่ภายในเซลล์ผ่านระบบ OCS นอกจาก cytoskeleton network แล้ว ยังมีโมเลกุลสำคัญอื่นๆ ของเกล็ดเลือดที่อยู่ในชั้นนี้ได้แก่ vimentin, talin, vinculin,

dystrophin-related protein และ protein kinase C-related proteins/ enzymes หลายชนิด⁸

Sol-gel zone

ประกอบด้วย fiber system ขนาดต่างๆ เนื่องจากมี polymerization แตกต่างกัน แบ่งเป็น 5 ชนิดดังนี้

1. Microtubule โครงสร้างเป็น polymer ของ α - และ β -tubulin สัมพันธ์กับโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ๆ หลายชนิด⁹ microtubule มีลักษณะเป็นแถบขนาดยาวอยู่ใต้ผิวเมมเบรนไปตามเส้นรอบวงส่วนที่ยาวที่สุด และแยกจากผิวเมมเบรนโดย submembrane filament ช่วยทำให้เกล็ดเลือดคงรูปร่าง discoid shape อยู่ได้

2. Microfilament คือ contractile system ของเกล็ดเลือด ประกอบด้วย contractile proteins หลายชนิด ชนิดที่สำคัญคือ actomyosin (thrombasthenin) ซึ่งประกอบด้วย **platelet actin** (หรือ thrombasthenin A) และ **platelet myosin** (หรือ thrombasthenin M)¹⁰ microfilament มีบทบาทสำคัญในการรักษาโครงสร้างของเกล็ดเลือด การตอบสนองของเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นเช่น การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การหลั่งสารจาก granule และ clot retraction เป็นต้น

3. Actin เป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดในการเกล็ดเลือด (15%) ในภาวะที่ถูกกระตุ้นจะเกิดการรวมตัวเป็นเกลียวคู่ (actin polymerization) อย่างรวดเร็ว ได้โครงสร้างใหม่เรียกว่า Double-helical filaments หรือเรียกว่า F-actin¹¹

4. Myosin มีประมาณ 1-2% ของปริมาณโปรตีนภายในเกล็ดเลือด โครงสร้างทางชีวเคมีประกอบด้วยสาย polypeptide จำนวน 6 สายเป็น light chain สายคู่ 2 ชุด และ heavy chain สายคู่ 1 ชุด¹⁰ ซึ่งจะรวมกันเป็น filament เมื่อเกิดการกระตุ้นบนผิวเกล็ดเลือด และช่วยทำให้เกิดแรงดึงภายใน กลไกของ polymerization เกิดจากการเติมหมู่ phosphate ในสาย light chain โดยอาศัย calcium และโปรตีน calmodulin¹²

5. Contractile protein อื่นๆ ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน แต่สามารถแยกได้จากเกล็ดเลือด ได้แก่ α -actin¹³, gelsolin¹⁴, profilin¹⁵, p235¹⁶ (หรือ band2),

vinculin¹⁷, ankylin¹⁸, protein 4.1¹⁹ และ tropomyosin²⁰

Organelle zone

บริเวณนี้ประกอบด้วย glycogen ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานผ่านกระบวนการ glycolysis โดยมี mitochondria เป็น energy house สิ่งที่สำคัญในบริเวณนี้คือ storage granule ซึ่งเป็น organelle ที่มีจำนวนมากที่สุดในเซลล์ ภายในมีสารชีวเคมีและโมเลกุลหลายชนิด มีบทบาทและทำหน้าที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากรูปร่าง ความหนาแน่น และสารชีวเคมีที่อยู่ภายในจะสามารถแบ่ง granule ออกเป็น 4 ชนิด²¹ ได้แก่ α -granule, dense granule, lysosome และ microperoxisome หากดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถมองเห็น α -granule และ dense granule ส่วน lysosome และ microperoxisome ต้องใช้การย้อมพิเศษ (cytochemistry) เนื่องจากโมเลกุลภายในประกอบด้วย enzymes และมีความแตกต่างกัน เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นจะเกิดการแตกของแกรนูลและปลดปล่อยสารเคมีต่างๆ ออกสู่ผิวเกล็ดเลือดและกระแสเลือด ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. α -granule

ถูกสร้างขึ้นในระยะท้ายของพัฒนา megakaryocyte มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 200 nm แต่ละเกล็ดเลือดมี α -granule ประมาณ 50-80 หน่วย แตกต่างกันว่า electron density เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทั้งนี้ขึ้นกับสารประกอบภายใน บริเวณที่มี electron density สูงๆ เรียกว่า nucleoid ซึ่งพบว่ามีสารชีวเคมีหลัก คือ β -thromboglobulin, platelet factor 4 (PF4) และ proteoglycan⁶ และหากเป็นบริเวณที่มี electron density ต่ำๆ หรือที่เรียกว่า electron lucent สารชีวเคมีที่พบจะเป็น tubular element ที่ภายในมี von Willebrand อยู่เป็นจำนวนมาก ผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Gray platelet syndrome ไม่มีการสร้าง von Willebrand ลักษณะของเกล็ดเลือดที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นสีเทา²² สารชีวเคมีที่พบได้ใน α -granule แบ่งเป็น 7 ประเภท²³ ดังนี้

1. **Platelet-specific protein** ประกอบด้วย PF4 และโปรตีนในกลุ่ม β -thromboglobulin family

2. **Adhesive glycoproteins** ประกอบด้วย Fibrinogen, vWF, Fibronectin, thrombospondin และ Vitronectin

3. **Coagulation factors/ Fibrinolytic inhibitors** ได้แก่ factor V, protein S, Factor XI, Factor VIII, α_2 -antiplasmin, Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), α_1 -protease inhibitor และ C1 inhibitor

4. **Mitogenic factors** ได้แก่ Platelet derived growth factor (PDGF), TGF- α , Endothelial growth factor (EDGF) และ Epidermal growth factor (EGF)

5. **Multimerin** เป็นสารประเภทไกลโคโปรตีน ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด พบอยู่ร่วมกับ vWF และบนผิวเกล็ดเลือดภายหลังการถูกกระตุ้น น่าจะมีความสำคัญเพราะพบได้เฉพาะบนผิวเกล็ดเลือดเท่านั้น ไม่พบในพลาสมาเลย

6. **Membrane-associated proteins** ได้แก่ gpIIb/IIIa, P-selectin, GMP-140, 24-kD GTP-binding protein, gpIV (CD36) และ Osteonectin

7. **Plasma proteins** ได้แก่ immunoglobulin (Ig) โดยพบว่าระดับ Ig ในพลาสมาสัมพันธ์กับระดับ Ig ในเกล็ดเลือด Ig พบได้ทั้งที่ผิวเมมเบรน และภายในแกรนูล แต่แหล่งเก็บสะสมหลักคือแกรนูล

2. Dense granule (δ -granule)²⁴

เป็นแกรนูลที่มีจำนวนมากที่สุดในเกล็ดเลือด ภายในประกอบด้วยแคลเซียมจำนวนมาก และโปรตีนหลักคือ Serotonin, ATP และ ADP เป็นแหล่งสะสมพลังงานของเกล็ดเลือด จากการศึกษาพบว่า อัตราส่วนของ ATP:ADP ในแกรนูลคิดเป็น 2:3 ใช้เป็นพลังงานสำหรับกระบวนการ release reaction ปลดปล่อย ADP ออกภายนอกเซลล์เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น และเกิดกระบวนการ secondary aggregation ต่อไป แต่อัตราส่วนของ ATP:ADP ใน cytoplasm มีมากกว่าคือประมาณ 8:1 และใช้สำหรับกระบวนการทางชีวเคมีทั้งหมดของเกล็ดเลือด ผู้ที่มีความผิดปกติในโรค δ -storage pool disease คือไม่มี Dense granule หรือมีน้อย จะสูญเสีย

หน้าที่ การทำงานของเกล็ดเลือดและเกิดพยาธิสภาพทางคลินิกได้

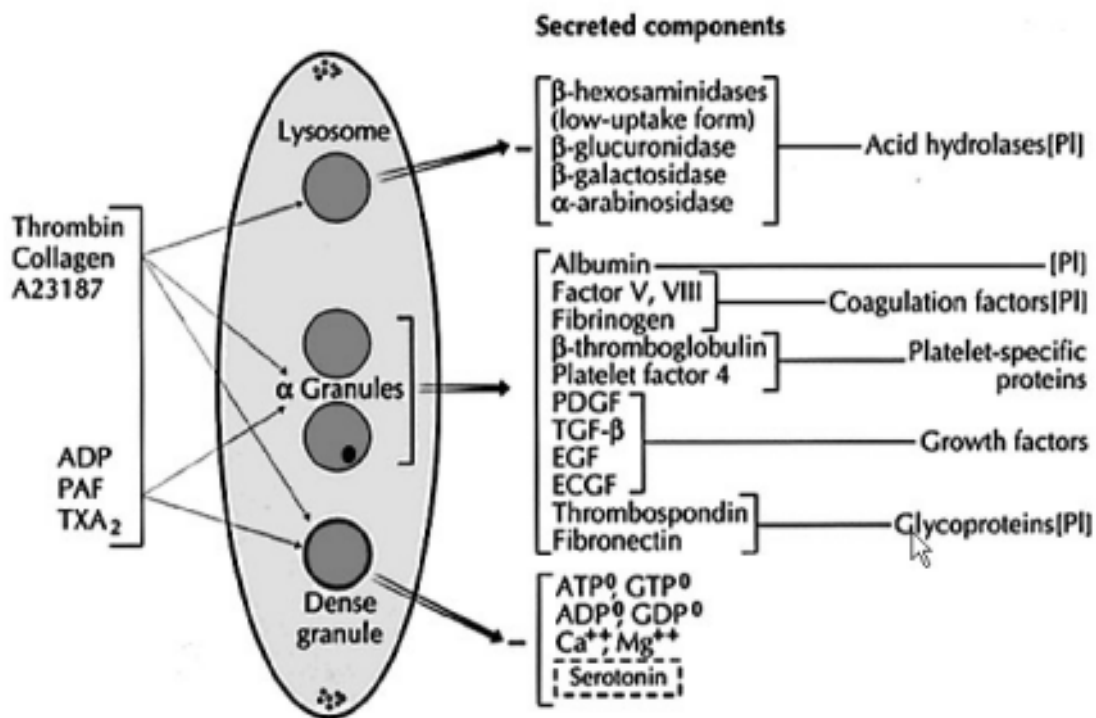
3. Lysosome (λ -granule)²⁴

เป็นแกรนูลชนิดที่หลังสารภายในได้ชื่อว่าแกรนูลสองชนิดแรก หรือต้องการสารกระตุ้น (platelet activator หรือ agonist) จำนวนมากกว่า โปรตีนสำคัญในแกรนูลแบ่งเป็นสองประเภทคือเอนไซม์ และโปรตีนที่เมมเบรนของแกรนูล เอนไซม์ที่พบคือเอนไซม์ในกลุ่ม Acid hydrolase (acid phosphatase, β -glucuronidase, cathepsins, arylsulfatase, β -hexosaminidase, β -galactosidase, heparitinase, β -glycerophos-

phatase, elastase และ collagenase) เอนไซม์บางชนิดเมื่อถูกหลั่งออกจากเกล็ดเลือดสามารถทำให้เกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดได้เช่น collagenase, heparitinase, elastase สำหรับโปรตีนที่เมมเบรนของแกรนูลคือ CD63 ซึ่งหากพบปรากฏบนผิวเกล็ดเลือดเป็นเครื่องหมายแสดงว่าเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นและเข้าสู่ขั้นตอนของ released reaction แล้ว

4. Microperoxisome²⁵

มีขนาดเล็กมาก ภายในประกอบด้วยเอนไซม์ประเภท catalase มีส่วนเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน เช่น การสังเคราะห์ plasminogen



รูปที่ 2 Secretory process และสารเคมีที่ถูกปล่อยออกจากแกรนูลทั้ง 3 ชนิดของเกล็ดเลือดภายหลังจากการถูกกระตุ้น

Membrane systems

ผิวเมมเบรนของเกล็ดเลือดทำหน้าที่เช่นเดียวกัน โดยแบ่งเป็น 2 ระบบตามโครงสร้างคือ Open canalicular system (OCS) และ Dense tubular system (DTS) ทั้งสองระบบมักอยู่ร่วมกัน เป็นที่น่าสังเกตว่า ทั้งสองระบบมีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกับ transverse tubular และ sarcotubules ของกล้ามเนื้อลาย แสดงให้เห็นว่าทั้ง OCS และ DTS ทำหน้าที่เทียบได้กับ sarcoplasmic reticulum ของเซลล์กล้ามเนื้อ

Open canalicular system (OCS)²⁶ เป็นส่วนของเมมเบรนที่เว้าเข้าไปภายใน cytoplasm มีความสำคัญดังนี้

1. ส่วนที่เว้าเข้าไปภายในเกิดเป็นโครงสร้างระบบท่อซับซ้อน ช่วยเอื้ออำนวยต่อการนำสารต่างๆ เข้าและออกจากเกล็ดเลือด
2. ส่วนที่เว้าช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวเมมเบรนในเวลาที่เกล็ดเลือดต้องการเช่น ขณะเกิด filopodia และ platelet spreading (หลังจากเกิด platelet adhesion)
3. ผนังของแตรงูลภายในเชื่อมต่อกับผนังเกล็ดเลือดผ่านทาง OCS ซึ่งนอกจากช่วยเป็นแหล่งเก็บ plasma membrane glycoproteins แล้ว ยังเป็นการเพิ่มปริมาณให้ในบางสภาวะ เช่น เมื่อกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย thrombin หรือ plasmin จะพบว่า membrane gpIb/IX หายไปหรือลดจำนวนลง แต่เป็นการถูกกักเก็บอยู่ใน OCS แทน หรือการกระตุ้นเกล็ดเลือดทำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ gpIIb/IIIa บนผิวเกล็ดเลือด ซึ่งเชื่อว่าส่วนหนึ่งที่เพิ่มขึ้นได้จากเมมเบรนของ OCS

Dense tubular system (DTS)²⁷ เป็นส่วนของ ER ของ megakaryocyte ภายในบรรจุเอนไซม์ peroxidase และเป็นแหล่งเก็บสะสมแคลเซียม โดยมีการนำเข้ามาจาก cytoplasm เพื่อรักษาระดับแคลเซียมใน cytoplasm ให้อยู่ในระดับต่ำเสมอ เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นจะปล่อยแคลเซียมออกจาก DTS เพื่อให้เกิดกระบวนการหดตัวและเปลี่ยนแปลงรูปร่างต่อไป DTS ยังเป็นแหล่งสะสมเอนไซม์สำคัญสำหรับ lipid metabolism จึงมีการสังเคราะห์ prostaglandins (PG) โดยอาศัย arachidonic acid ที่ผิวเมมเบรนของ DTS เป็นสารเริ่มต้น เอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ phospholipase A₂, diglyceride

lipase, cyclooxygenase และ thromboxane synthase

Structural profile of platelet membrane

บนผิวเกล็ดเลือดประกอบด้วยโมเลกุลต่างๆ มากมาย ที่มีความแตกต่างทางชีวเคมี ได้แก่ โปรตีน ไกลโคโปรตีน ไกลโคลิปิด ซัลเฟตโปรตีน ฯลฯ โมเลกุลที่พบมากที่สุดคือไกลโคโปรตีน และมีบทบาทต่อหน้าที่ของเกล็ดเลือดมากที่สุดเช่นเดียวกัน โมเลกุลเหล่านี้แสดงความเป็นแอนติเจนได้ และยังพบด้วยว่าโมเลกุลบางชนิดปรากฏเฉพาะบนผิวเกล็ดเลือดเท่านั้น (platelet specific antigen) บางชนิดสามารถพบได้บนผิวเซลล์อื่นๆ ด้วย (platelet common antigen)

Platelet glycolipids

Glycolipids บนผิวเกล็ดเลือดมีประมาณเล็กน้อย ประกอบด้วยส่วนคาร์โบไฮเดรตและไขมัน ประจุมอาจเป็นลบหรือเป็นกลางก็ได้ บางชนิดอาจมี sialic acid หรือหมู่ซัลเฟตอยู่ภายในโมเลกุล ส่วนมากพบอยู่ภายนอกของเมมเบรน แต่บางชนิดอาจอยู่ที่เมมเบรนของ intracellular organelles

Glycolipids มีส่วนเกี่ยวข้องกับ receptor-mediated activities หลายกระบวนการ ได้แก่ adhesion, immune response และ cell proliferation/differentiation

Biochemistry of glycolipids²⁸

Glycolipids โดยทั่วไปประกอบด้วยโมเลกุลหลัก 3 ส่วนคือ fatty acid, sphingosine และ monosaccharide รูปที่ 3 แสดง Glucosyl ceramide หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า galactosyl cerebroside ซึ่งเป็น glycolipids ชนิดหนึ่ง

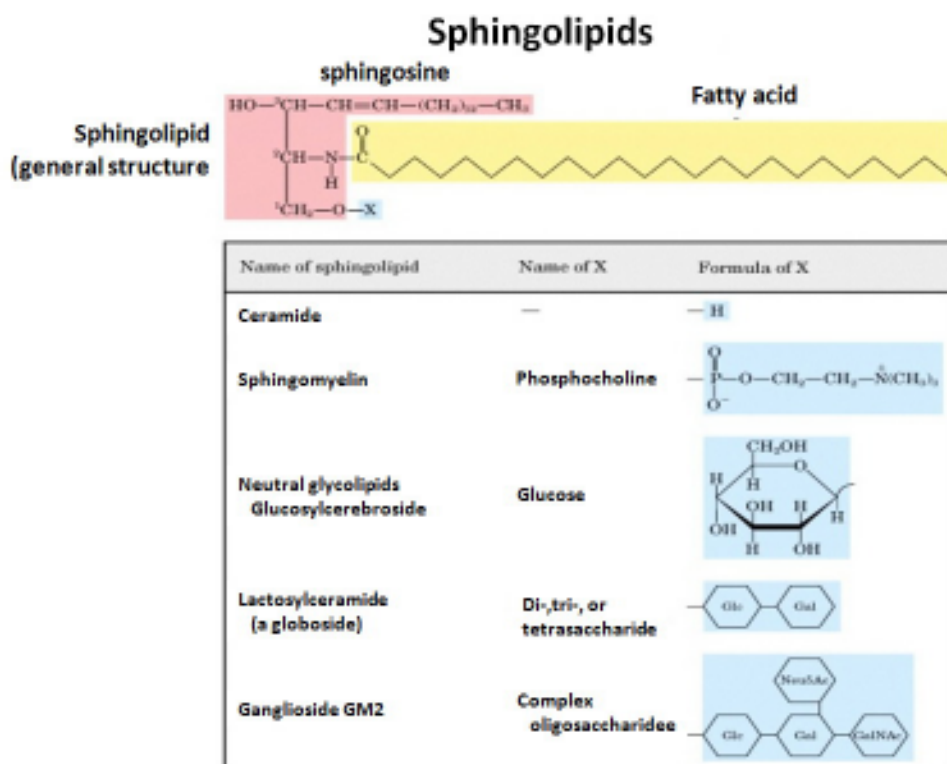
1. Sphingosine เป็น aminoalcohol ซึ่งถูกเติมหมู่ acyl ที่ amine group สังเคราะห์ขึ้นจาก serine และ palmitate

2. Fatty acid เป็นกรดไขมัน โดยปกติมักพบชนิดมีสายคาร์บอนขนาดยาว ประกอบด้วยคาร์บอนตั้งแต่ 16-24 อะตอม โครงสร้างเป็นได้ทั้ง saturated และ unsaturated form แต่ไม่ค่อยพบที่เป็น polyunsaturated form สำหรับชนิดของ fatty acid ที่พบเป็นองค์ประกอบ

sphinganine (dihydrosphingosine), และ 4-hydroxysphinganine (phytosphingosine) โครงสร้างดังกล่าวก่อประกอบด้วยคาร์บอน 18 อะตอม แต่ sphingosine เป็นชนิดที่พบมากใน mammalian cells

ไกลโคลิปิดแบ่งเป็นสองชนิดคือ acidic lipids และ neutral lipids ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนหมู่ น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ แต่ส่วนใหญ่เป็นชนิด neutral ไกลโคลิปิดบนผิวเกล็ดเลือดที่สามารถพบบนเม็ดเลือดแดง และแสดงคุณสมบัติเป็นแอนติเจนหมู่เลือดได้แก่หมู่เลือด ระบบ ABO, Lewis และ H ไกลโคลิปิดที่เป็นกรดมีสองชนิดคือ gangliosides ซึ่งมีหมู่ น้ำตาลเป็น sialic acid และ sulfatides ซึ่งมีหมู่ sulfate ประกอบอยู่ในโมเลกุลตามลำดับ

โครงสร้างร่วมระหว่าง sphingosine และ fatty acid เรียกว่า **ceramide** กรดไขมันที่ปรากฏอยู่มีหลายชนิด จึงทำให้ sphingosine มีความแตกต่างกันไปด้วยทั้งจำนวนคาร์บอนอะตอม จำนวนพันธะคู่ และความแตกต่างของ alkyl chain ตัวอย่างที่พบบ่อยในเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไป ได้แก่ 4-sphingenine (sphingosine),



รูปที่ 3 โครงสร้างทางชีวเคมีของ glycolipids

lactosylceramide (64% ของ neutral lipids ทั้งหมด)
รองลงมาก็คือ trihexosylceramide และ globoside
ตามลำดับ ส่วน ganglioside ชนิดที่พบมากที่สุดคือ
hematoside หรือ GM3 ดังแสดงในตารางที่ 1

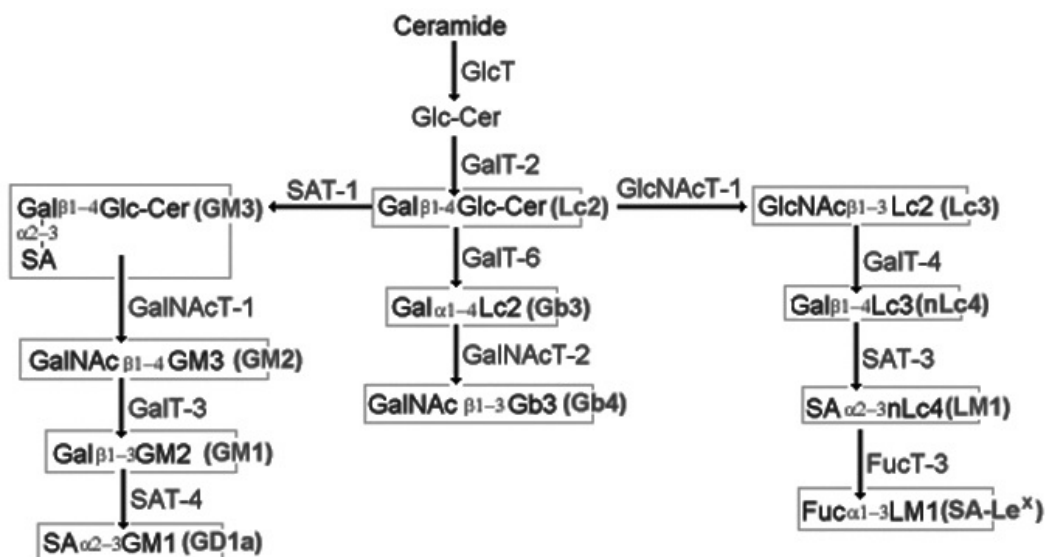
ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณของ glycolipids และ gangliosides ชนิดต่าง ๆ บนเกล็ดเลือด

ชนิด	ส่วนประกอบในโครงสร้าง	ปริมาณ (nmol/10 ⁹ platelet)
Ceramides	Cer	3.48
Glucosylceramide	Cer-Glu	0.02
Lactosylceramide	Cer-Glu-Gal	1.39
Trihexosylceramide	Cer-Glu-Gal-Gal	0.56
Globoside	Cer-Glu-Gal-Gal-NAcGal	0.42
Hematoside (GM3)	Cer-Glu-Gal-NANA	0.63

Cer: ceramide, Glu: glucose, Gal: Galactose, NAcGal: N-acetyl-galactosamine, NANA: Sialic acid

สำหรับ gangliosides มีประมาณ 0.5% ของ total platelet lipids ที่พบมากคือ **Ganglioside I** (หรือ GM3 หรือ hematoside) น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบคือ glucose, galactose และ sialic acid) ดังแสดงในรูปที่ 4 และมีปริมาณมากที่สุดคือประมาณ 92% ของ total

platelet ganglioside และ **Ganglioside II** ซึ่งพบประมาณ 5% ของ total platelet ganglioside (น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบเรียกชื่อว่า Lacto-N-neotetraose ประกอบด้วยน้ำตาล glucose, galactose, sialic acid และ hexosamines)



รูปที่ 4 Gangliosides ชนิดต่าง ๆ

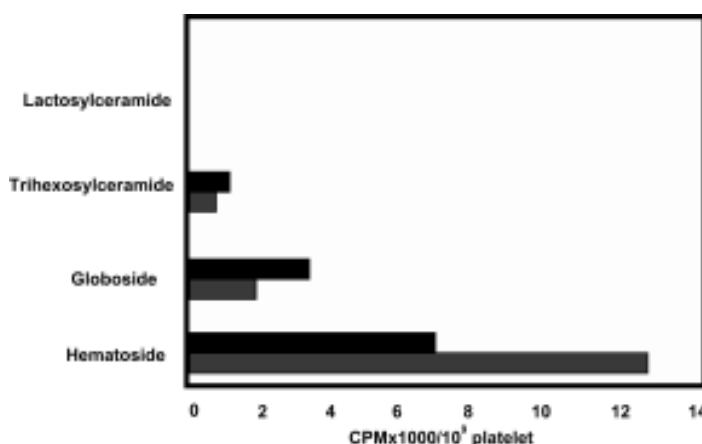
Localization of glycolipids in platelet: Receptor-mediated activities

Glycolipids อยู่ที่เมมเบรนของเกล็ดเลือดทั้งส่วนนอกและ organelle ภายในเกล็ดเลือด โดยมีส่วนที่ชอบน้ำคือ hexose ออกสู่ภายนอกเซลล์ หรือออกสู่ส่วน cytoplasm ลักษณะเช่นนี้จึงเชื่อว่าโมเลกุลดังกล่าวน่าจะมีบทบาทในลักษณะของ receptor-mediated activities จากการศึกษาพบว่าในภาวะปกติมีการแสดงออกของ hematoside บนผิวเมมเบรนมากที่สุด รองลงมาคือ globoside และ trihexosylceramides แต่ไม่พบ lactosylceramide เลย²⁸ เมื่อกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย thrombin พบความแตกต่างในการแสดงออก ดังแสดงในรูปที่ 5 กล่าวคือ hematoside เพิ่มจำนวนการแสดงออกมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ตรงข้ามกับ globoside และ trihexosylceramide ลดจำนวนลง ผู้วิจัยอธิบายว่าการกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย thrombin น่าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิวเมมเบรน โดยมีการจัดเรียงตัวใหม่ รวมถึงการนำเมมเบรนของ cytoplasmic organelles ออกสู่ผิวเกล็ดเลือดด้วย ทำให้โมเลกุลบางส่วนลดจำนวนลงและบางส่วนเพิ่มปริมาณขึ้น และโมเลกุลที่เพิ่มมากขึ้นน่าจะมีบทบาทต่อการตอบสนองของเกล็ดเลือดต่อสารกระตุ้นเลือดด้วยเช่นกัน เช่น hematoside ซึ่งพบว่าสามารถจับได้กับ serotonin เป็นต้น แม้ว่า gangliosides จะสามารถจับโมเลกุลหลายชนิด และพบได้ในหลายเซลล์ และการจับยังมีความจำเพาะต่ำ

ไม่น่าจะใช้อธิบายความสำคัญของ ganglioside บนผิวเกล็ดเลือด แต่จากการศึกษาน่าจะยืนยันความสำคัญได้ เพราะ ganglioside สามารถจับ และทำหน้าที่เป็น cofactor, modulator หรือ auxilliary receptor ให้กับโปรตีนสำคัญหลายชนิดได้แก่ thyrotropin, interferon, chorionic ganadotropin เพื่อให้การจับกัน ระหว่าง receptor-ligand ทำได้ดียิ่งขึ้น เพราะ gangliosides ช่วยควบคุมกำกับการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับ cell-cell ineteraction เช่น tyrosine kinase ช่วยยับยั้งการทำงานของ protein kinase C

Sulfatides

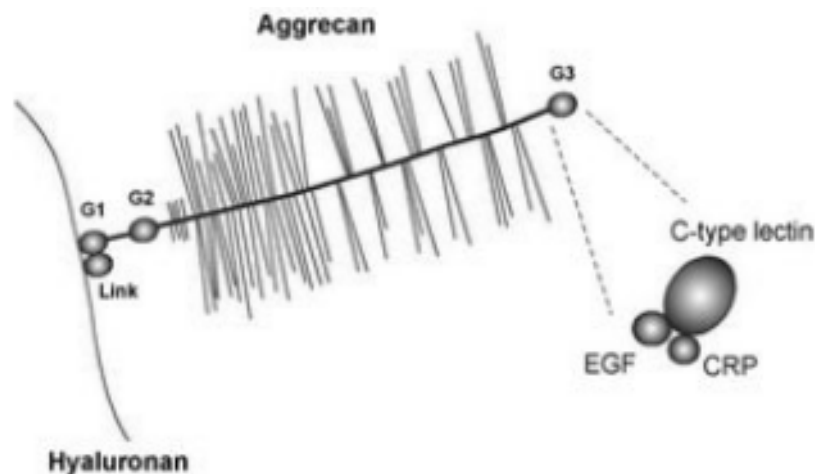
Sulfatides เป็นโมเลกุลที่มีประจุลบเนื่องจากโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ซัลเฟต พบได้น้อยในเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ มีส่วนเกี่ยวข้องกับ cell maturation³⁰ และ ATPase activity³¹ นอกจากนี้ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดอีกด้วย sulfatides สามารถจับกับ adhesion protein เช่น thrombospondin และ vWF เกล็ดเลือดเป็นแหล่งใหญ่สำหรับ sulfatides การศึกษาพบว่า platelet sulfatides ทำหน้าที่เป็นตัวรับจำเพาะสำหรับ thrombospondin และ vWF³² นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ sulfatides บนผนังหลอดเลือดด้วย ซึ่งเป็นการยืนยันบทบาทของโมเลกุลดังกล่าว ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ hemostasis ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทั้งเกล็ดเลือดและผนังหลอดเลือดทำงานร่วมกัน



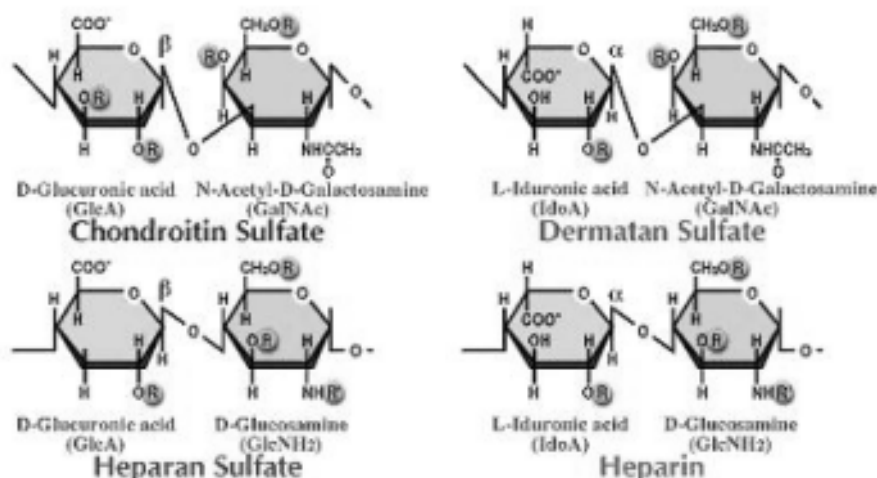
รูปที่ 5 The exposure of gangliosides and neutral glycolipids on platelet surface (รูปภาพดัดแปลงจาก platelet Immunobiology: Molecular and clinical aspects, Kunicki TJ, 1989)

Proteoglycan คือ glycoprotein ที่ประกอบด้วย ส่วนของโปรตีนแกนกลาง (core protein) และส่วนของ glycosaminoglycans ซึ่งมีลักษณะเป็น sulfated polysaccharide (รูปที่ 6) ประกอบขึ้นด้วย repeating disaccharide ของ uronic acid และ galactosamine (รูปที่ 7) จำนวน 40-100 repeating ความแตกต่างของชนิด disaccharide ทำให้ glycosaminoglycans มีชื่อเรียกแตกต่างกันเช่น chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate, heparin หรือ heparan sulfate

Proteoglycan แต่ละชนิดมีน้ำหนักโมเลกุล และชนิดของ glycosaminoglycans ที่แตกต่างกัน พบได้บนผิวเซลล์ต่างๆ ทั่วร่างกาย มีทั้งที่เป็น membrane molecules และ secretory molecules ใน matrix มีส่วนเกี่ยวข้องกับ cell activities หลายอย่างได้แก่ cell adhesion, migration, growth and differentiation เป็นตัวรับจำเพาะร่วมให้แก่โปรตีนสำคัญหลายชนิดเช่น cytokine, ApoE และ growth factor เป็นต้น



รูปที่ 6 โครงสร้างทางชีวเคมีของ proteoglycans



รูปที่ 7 ชนิดของ disaccharides ใน glycosaminoglycans

สำหรับ Proteoglycans ของเกล็ดเลือด ส่วนใหญ่เป็น chondroitin-4-sulfate (CS)³³ และพบ mucopolysaccharide บ้างแต่ในปริมาณน้อย การกระตุ้นเกล็ดเลือดด้วย thrombin ทำให้มีการหลั่ง chondroitin-4-sulfate ออกจากเกล็ดเลือด จากการศึกษพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 kD และเชื่อว่าทำหน้าที่เป็นโมเลกุลนำพา PF4 โดยในการนำพาจะอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบด้วย PF4 จำนวน 8 หน่วยและ CS จำนวน 2 หน่วย แหล่งสะสม CS ในเกล็ดเลือดอยู่กระจายกันในสัดส่วนดังนี้ ประมาณ 55% เป็น granular fraction ประมาณ 43% เป็นส่วน soluble fraction และอีก 2% เป็น membrane fraction

การศึกษาของหลายกลุ่มวิจัยเพื่อระบุแหล่งสะสมของ proteoglycans ว่าอยู่ที่ส่วนใดบ้างของเกล็ดเลือด โดยการใช้สีย้อมจำเพาะกับ anionic compound และ mucopolysaccharide เช่น ruthenium red, dialyzed iron, antimonite และ pyroantimonate ได้ข้อสรุปตรงกันว่า proteoglycans มีแหล่งสะสมมาก ที่สุดอยู่ใน α -granules นอกนั้นกระจายอยู่ในเมมเบรน ทั้งที่อยู่ใน demarcation membrane system (DMS) และ plasma membrane ของทั้งเกล็ดเลือดและ megakaryocytes

เอกสารอ้างอิง

- Kieffer N, Guichard J, Farcel JP, et al. Biosynthesis of major proteins in human platelets. *Eur J Biochem* 1987; 164: 189
- George JN, Dale GL. Platelet kinetics. In: Beutler E, Lichtman MA, Collar BS, Kipps TJ, Eds. *Williams Hematology*. 5th Edition. New York, McGraw-Hill Publishing Company, 1995; 1202
- Shulman NR, Watkins SP Jr, Itscoitz SB, et al. Evidence that the spleen retains the youngest and hemostatically most effective platelets. *Trans Assoc Am Physicians* 1968; 81: 302
- Heyns A Du P. Thrombopoiesis and platelet kinetics. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, Eds. *Hemostasis and thrombosis*. 3rd Edition. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994: 31
- Thompson CB, Love DG, Guinn PG, et al. Platelet size does not correlate with platelet age. *Blood* 1983; 62: 487
- White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, Eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. 3rd Edition. Philadelphia, Lippincott, 1994: 397
- Schafer AI. The platelet life cycle: Normal function and qualitative disorders. In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP, Eds. *Blood principles and practice of hematology*. Philadelphia, Lippincott, 1995: 1095
- Fox JE, Boyles JK, Berndt MC, et al. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol* 1988; 106: 1525
- Castle AG, Crawford N. Platelet microtubule subunit proteins. *Thromb Haemost* 1979; 42: 1630
- Bithell TC. Platelets and megakaryocytes. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, Eds. *Wintrobe's clinical hematology*. 9th Edition. Philadelphia, Lea&Febiger, 1993: 511
- Rosenberg S, Stracher A, Lucas RC. Isolation and characterization of actin and actin binding protein from human platelets. *J Cell Biol* 1981; 91: 201
- Hathaway DR, Adelstein RS. Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1653
- Landon F, Olomucki A. Isolation and physio-chemical properties of blood platelet α -actin. *Biochem Biophys Acta* 1983; 742: 129
- Lind SE, Yin HL, Stossel TP. Human platelets contain gelsolin, a regulator of actin filament

- length. *J Clin Invest* 1982; 69: 1384
15. Markey F, Persson T, Lindberg U. Characterization of platelet extracts before and after stimulation with respect to the possible role of profilactin as microfilament precursor. *Cell* 1982; 143: 205
 16. Collier NC, Wang K. Human platelet p235: a high Mr protein which restricts the length of actin filaments. *FEBS Lett* 1982; 143: 205
 17. Rosenfeld GC, Hou DC, Dingus J, et al. Isolation and partial characterization of human platelet vinculin. *J Cell Biol* 1985; 100: 669
 18. Bennett V. Immunoreactive forms of human erythrocyte ankyrin are present in diverse cells and tissue. *Nature (London)* 1979; 281: 597
 19. Spiegel JE, Beardsley DS, Southwick FS, et al. An analogue of the erythroid membrane skeletal protein 4.1 in nonerythroid cells. *J Cell Biol* 1984; 99: 886
 20. Cote GP, Smillie LB. preparation and some properties of equine platelet tropomyosin. *J Biol Chem* 1981; 256: 11004
 21. Stenberg PE, Bainton DF. Storage organelles in platelets and megakaryocytes. In: Phillips DR, Shuman MA, Eds. *Biochemistry of platelets*. Orlando, Academic Press, 1986: 257
 22. Raccuglia G. Gray platelet syndrome: a variety of quantitative platelet disorder. *Am J Med* 1971; 51: 818
 23. Niewiarowski S, Holt JC, Cook JJ. Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, Eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*, 3rd Edition. Philadelphia, Lippincott, 1994: 546
 24. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, Eds. *Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*, 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott, 1994: 524
 25. Breton-Gorius J, Guichard J. Ultrastructural localization of peroxidase activity in human platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol* 1972; 66: 277
 26. Behnke O. The morphology of blood platelet membrane systems. *Series Haematol* 1970; 3: 3
 27. White JG. Interaction of membrane systems in blood platelets. *Am J Pathol* 1972; 66: 295
 28. Wang CT, Schick PK. The effect of thrombin on the organization of human platelet glycosphingolipids: The sphingosine composition of platelet glycolipids and ceramides. *J Biol Chem* 1981; 256: 752
 29. Tao RV, Sweeley CC, Jamieson GA. Sphingolipid composition of human platelets. *J Lipids Res* 1973; 14: 16
 30. Singh H, Pfeiffer SE. Myelin-associated galactolipids in primary cultures from dissociated fetal rat brain: Biosynthesis, accumulation, and cell surface expression. *J Neurochem* 1985; 45(5): 1371
 31. Zambrano F, Rojas M. Sulfatide content in a membrane fraction isolated from rabbit gastric mucosa: Its possible role in the enzyme involved in H⁺ pumping. *Arch Biochem Biophys* 1987; 253: 87
 32. Roberts DD, Williams SB, Gralnick HR, Ginsberg V. von Willebrand factor binds specifically to sulfated glycolipids. *J Biol Chem* 1986; 261: 3306
 33. Olsson I, Gardell S. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from human leukocytes and platelets. *Biochim Biophys Acta* 1967; 141: 348