

บทความทั่วไป**Development and production of platelet, functional importance in hemostasis**

ปริญานาด วงศ์จันทร์*

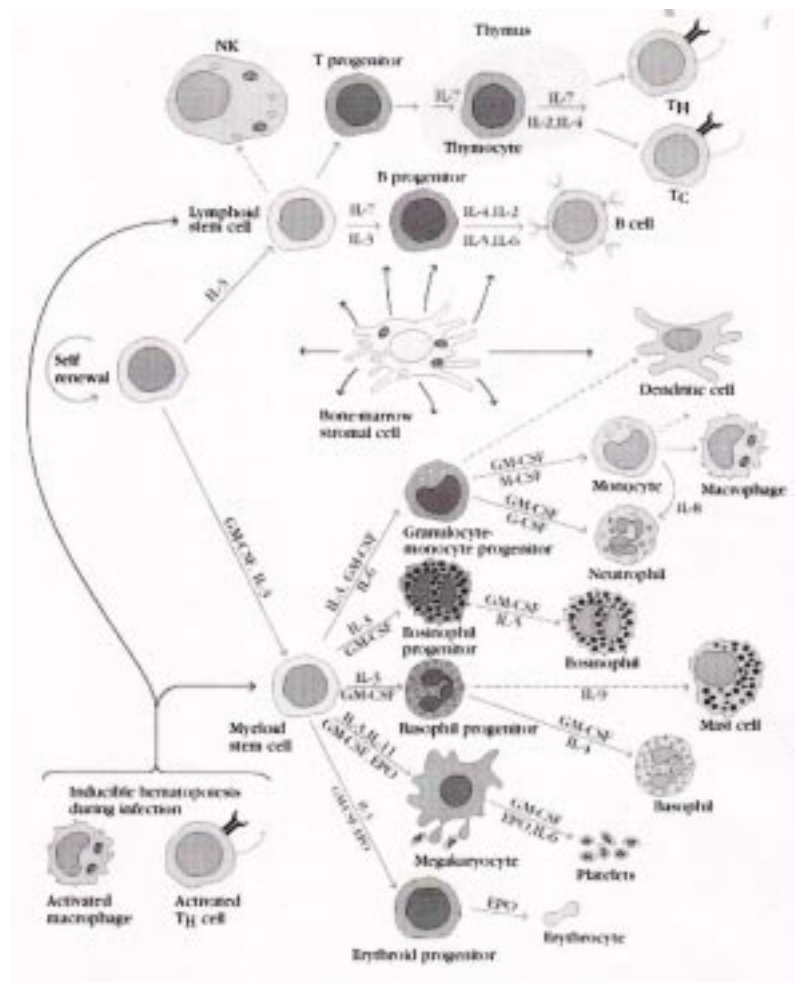
บทนำ

เกล็ดเลือด คือส่วนประกอบของเลือดที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหยุดเลือดและการแข็งตัวของเลือด สร้างจาก megakaryocytes ดังนั้นการเรียนรู้และเข้าใจถึงพัฒนาและการสร้างเกล็ดเลือดจึงมีความสำคัญ อย่างไรก็ตามการศึกษาเรื่องของ megakaryocytes ทำได้จำกัด เพราะเป็นเซลล์ที่พบได้น้อยในไขกระดูก (ประมาณ 0.05-0.5% ของ nucleated cell) megakaryocytes มีขนาดใหญ่และนิวเคลียสมีหลาย lobes (polyploidy) ปัจจุบันความรู้เกี่ยวกับการควบคุมการสร้างเม็ดเลือด (hematopoiesis) และการเพาะเลี้ยง megakaryocyte progenitor cells ทำให้เรามีความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการสร้าง megakaryocyte มากขึ้น

Development of megakaryocyte

Megakaryocyte พัฒนามาจาก megakaryocyte progenitor ซึ่งพัฒนาจากเซลล์ต้นกำเนิด (Undifferentiated pluripotent stem cell, PPSC) เดียวกับเซลล์ในสายเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว¹ ดังแสดงในรูปที่ 1 megakaryocyte progenitor แบ่งเป็น 2 ระยะแตกต่างกันตามการพัฒนา โดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ ลักษณะ และชนิดของ colony ที่เกิดขึ้น ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตขณะเพาะเลี้ยง และความแตกต่างของแอนติเจนบนผิวเซลล์ คือ ระยะที่ 1 Burst-forming unit-megakaryocyte (BFU-MK) และระยะที่ 2 Colony-forming unit-megakaryocyte (CFU-MK) ดังแสดงในตารางเปรียบเทียบตารางที่ 1

* แขนงวิชาวิทยาศาสตร์การธนาคารเลือด ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



รูปที่ 1 Human megakaryocyte ontogeny และ Regulatory influences

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง BFU-MK และ CFU-MK

Characteristics	BFU-MK	CFU-MK
Time <i>in vitro</i> appearance	21 days (human)	12 days (human)
Colony appearance	Multiple clusters of megakaryocytes	Unifocal
Number of cells/colony	Larger (108.6 ± 4.4)	Smaller (11.6 ± 1.2)
5-Fluorouracil treatment	Resistant	Sensitive
CD34 Expression	Positive	Positive
Membrane HLA-DR expression	Negative	Positive
Velocity sedimentation gradients, centrifugal elutriation	80% in fractions, 12-14 ml/min	70% in fractions, 18-20 ml/min

เมื่อได้รับการกระตุ้นที่เหมาะสม megakaryocyte progenitor จะมีการแบ่งตัวและเปลี่ยนรูปร่างเป็น diploid cells ซึ่งมีความสามารถในการแบ่งตัวจำกัดเรียกว่า **Transitional cell** หรือ **Promegakaryoblast**¹ ปกติพบได้ประมาณ 5-10% ของ megakaryocyte ทั้งหมดในไขกระดูก รูปร่างและขนาดใกล้เคียง lymphocyte บนผิวเซลล์พบการแสดงออกของ gpIIb-IIIa และใน cytoplasm พบ vWF และ platelet factor 4 (PF4) Transitional cell ไม่มีการสร้าง colony แต่จะเจริญเป็น mature megakaryocyte ซึ่งมีลักษณะเป็น polyploidy (นิวเคลียสเป็น lobe แต่ละ lobe มีจำนวน DNA = 2n ด้วยกระบวนการแบ่งสร้าง DNA หรือนิวเคลียสมากขึ้นโดยที่นิวเคลียสและเซลล์ไม่แยกออกจากกัน กระบวนการนี้เรียกว่า Endomitosis หรือ Endoreduplication) ลักษณะ polyploidy เป็นลักษณะเด่นของ megakaryocyte และพบมากขึ้นในภาวะที่มีความต้องการเกล็ดเลือดหรือมีการรบกวนการสร้างเกล็ดเลือด อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบว่าปัจจัยใดที่มีส่วนในการควบคุมการสร้าง DNA การแบ่งตัว (mitosis) และ endomitosis เพราะบางเซลล์มีการแบ่งตัวในขณะที่บางเซลล์ไม่เกิดกระบวนการดังกล่าว² เมื่อเซลล์แก่ตัวขึ้นมีการสร้างโปรตีนและส่วนประกอบทางชีวเคมีอื่นๆ มีการเพิ่มปริมาณของ cytoplasm มีการสร้าง organelles และ demarcation system (DMS) ซึ่งสุดท้ายจะเป็นส่วนประกอบของผิวเกล็ดเลือด

Megakaryocyte maturation

Megakaryocytes เป็น hematopoietic cells ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดแต่มีจำนวนน้อยที่สุด มีรูปร่างหลายแบบ แต่โดยรวมมีลักษณะเป็น polyploidy (มีนิวเคลียสหลาย lobe) แต่ไม่ใช่ multinucleated cell ดังนั้นจึงต้องพิจารณาแยกชนิดจาก osteoclast ด้วย ภาวะปกติ polyploidy มีจำนวนชุดของ DNA 3 แบบคือ 16n (มากที่สุดคือประมาณ 40%), 32n (20%) และ 8n (16%) กระบวนการแก่ตัวของ Megakaryocytes สามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ โดยอาศัยปัจจัยหลายอย่าง³ ได้แก่ N/C ratio (nuclear/cytoplasm) รูปร่างของนิวเคลียส โครงสร้างการติดสีของ cytoplasm ระยะเวลาที่ใช้เปลี่ยนแปลงจากระยะ megakaryoblast จนถึงการสร้างเกล็ดเลือด

ระยะที่ 1 (Megakaryoblast) มีขนาด 6-24 ไมครอน N/C ratio สูงที่สุด นิวเคลียสเป็น lobe และมี compact cytoplasm ย้อมติดสีน้ำเงิน และสามารถพบ α -granules, dense body, microtubule และ DMS เซลล์ในระยะนี้ยังมีการสร้าง DNA และมีกระบวนการ endomitosis อยู่ได้

ระยะที่ 2 (Promegakaryocyte) มีขนาด 14-30 ไมครอน นิวเคลียสรูปร่างคล้ายเกือกม้า ปริมาณ cytoplasm มีมากขึ้น ติดสีน้ำเงินจาง และสามารถพบ organelles ต่างๆ มากขึ้น DMS มีการพัฒนามากขึ้นในส่วนกลางของเซลล์ เชื่อกันว่าการสร้าง DNA และกระบวนการ endomitosis หยุดลงในระยะนี้

ระยะที่ 3 (Granular megakaryocyte) ขนาดใหญ่ขึ้นอีกเป็นประมาณ 16-56 ไมครอน นิวเคลียสเป็น lobe ส่วน cytoplasm มีปริมาณมากขึ้นและติดสีชมพู granules ภายใน DMS ขยายมากขึ้นแต่ยังมีลักษณะ asymmetric

ระยะที่ 4 (Mature megakaryocyte) ขนาด 20-50 ไมครอน นิวเคลียสเป็นหลาย lobes ส่วน cytoplasm ติดสีชมพู DMS กระจายทั่วเซลล์ โดยมี granules เรียงตัวเป็น platelet field

หมายเหตุ Demarcation membrane system หรือ DMS เป็นระบบ smooth membrane ที่แบ่ง cytoplasm ออกเป็นส่วนๆ หรือบริเวณ (platelet territories) ยังไม่ทราบที่มาชัดเจน แต่พบได้เฉพาะใน mature megakaryocytes เท่านั้น ผิวของ DMS และ platelet membrane มีโครงสร้างคล้ายกันคือสามารถพบ gpIIb-IIIa และ gpIb-IX complex⁴

Regulation of megakaryocyte development

จากการศึกษาพบว่าจำนวนเกล็ดเลือดในกระแสเลือดขึ้นกับปัจจัย 4 ข้อได้แก่ จำนวนของ megakaryocytes และปริมาณของ cytoplasm ใน megakaryocytes นอกจากนี้ยังขึ้นกับอายุของเกล็ดเลือดและจำนวนเกล็ดเลือดที่กักเก็บอยู่ในม้าม (splenic pool) ดังนั้นปัจจัยที่ควบคุมการแบ่งตัวและการพัฒนาของ megakaryocyte จึงมีความสำคัญในการควบคุมจำนวนเกล็ดเลือดในกระแสเลือด การศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า

หากทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำในสัตว์ จำนวนขนาดและ ploidy ของ megakaryocytes จะเพิ่มขึ้นในเวลาเดียวกันปริมาตรของเกล็ดเลือด (mean platelet volume) ก็เพิ่มขึ้นด้วย⁵ การตอบสนองของ CFU-MK ไม่ได้เป็นไปตามที่ตามจำนวนเกล็ดเลือดที่ลดต่ำลง แต่เกิดขึ้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของ mature megakaryocyte ดังนั้นจึงเชื่อกันว่า megakaryocytopoiesis ถูกควบคุมโดยสารหลังระดับต่างๆ กัน ได้แก่ การควบคุมในระดับ progenitor cell และในระดับ Terminally differentiating cell ซึ่งได้แก่ Megakaryocyte colony-stimulating factor, MK-CSF (หรือปัจจุบันเรียกว่า Megakaryocyte colony-stimulating factor, MK-CSA และ Thrombopoietin)⁶

ปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องและกำกับการพัฒนาและการเจริญของ megakaryocyte แบ่งออกเป็นสามส่วน (humoral factors) และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ (cellular interaction, cell derived regulators of megakaryocytopoiesis) ดังนี้

สารน้ำที่มีส่วนเกี่ยวข้องและกำกับการพัฒนาของ megakaryocyte

ได้แก่ MK-CSA, Thrombopoietin (หรือ myeloproliferative leukemia ligand, *mpl*) และ cytokines บางชนิดที่พบว่าช่วยในการทำหน้าที่ของ myeloproliferative leukemia ligand

Megakaryocyte colony-stimulating action (MK-CSA)

ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้าง colony และการแบ่งตัวของ megakaryocyte สามารถตรวจพบได้ในซีรัม ปัสสาวะของผู้ป่วยที่มีภาวะเกล็ดเลือดต่ำ หรือผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน⁷ MK-CSA มีระดับสูงขึ้นในทางผกผันกับ megakaryocyte mass ในไขกระดูก ระดับจะกลับสู่ปกติเมื่อมีการปลูกถ่ายไขกระดูกและเกิด engraftment แล้ว อย่างไรก็ตามเนื่องจากปริมาณน้อย ทำให้การแยกจากซีรัมและการศึกษาคุณสมบัติของสารน้ำชนิดนี้ยังไม่ก้าวหน้ามากนัก

Thrombopoietin (หรือ myeloproliferative leukemia ligand, *mpl*)

มีชื่อเรียกหลายอย่างได้แก่ thrombopoietic stimulating factor (TSF), megakaryocyte potentiator (MK-POT) และ megakaryocyte stimulating factor (MSF)^{8,9} ออกฤทธิ์ต่อ megakaryocyte ช่วยเพิ่ม ploidy ช่วยทำให้เกิด specific organelles ใน cytoplasm ช่วยทำให้เกิด membrane antigen และ platelet glycoproteins ช่วยการปล่อยเกล็ดเลือดออกจาก megakaryocyte และทำให้ปริมาณเกล็ดเลือดในกระแสเลือดกลับสู่ปกติ

อวัยวะหลักที่สร้าง TPO คือโดยตับและไต กำหนดการสร้างโดยยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 3 (p27-28)¹⁰ โครงสร้างทางชีวเคมีแบ่งออกเป็น 2 domains คือ Erythropoietin-like domain (หรือ TPO153) อยู่ที่ปลาย n-terminal มีลำดับกรดอะมิโนจำนวน 153 residues มีส่วนคล้ายกับ erythropoietin (23% homology) และปลาย c-terminal domain จำนวน 179 amino acids ที่มี glycosylation จากการศึกษพบว่า active site ในการกระตุ้น *mpl* อยู่ที่ปลาย n-terminal และไม่มี species specific อีกด้วย

TPO สามารถกระตุ้นการฟื้นตัวของ megakaryocyte และเกล็ดเลือดในผู้ป่วยที่มีเกล็ดเลือดต่ำ โดยพบว่ามีสารน้ำหลายชนิดมีส่วนช่วยในการทำงานของ TPO ได้แก่ IL-3, Stem cell factor (SCF) IL-11 และ erythropoietin¹² จากการศึกษพบว่า TPO มี receptor บนผิว megakaryocyte คือ *mpl* receptor ซึ่งนอกจากพบบน megakaryocyte และเกล็ดเลือดแล้ว ยังพบได้บนผิวเซลล์ต้นกำเนิด (CD34⁺ cells) ม้าม ไขกระดูกและ fetal liver¹¹ จากการศึกษในสัตว์ทดลองพบว่าในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของ *mpl* receptor จะมีจำนวนเกล็ดเลือดลดลงถึง 85% และจำนวน megakaryocyte ในไขกระดูกลดลง ปัจจุบันนักวิจัยจึงใช้ *mpl* receptor สำหรับช่วยแยก TPO ออกจากพลาสมา หรือจากเซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้เทคนิค affinity chromatography และพบว่า TPO ที่แยกได้สามารถช่วยเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดได้ถึง 4 เท่าภายใน 5 วันเมื่อใช้ฉีดให้หนูทดลองที่เกิดภาวะ thrombocytopenia

หมายเหตุ ที่มาของ ***mpl* receptor** คือการพบไวรัสของหนูชื่อ myeloproliferative leukemia ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถ transduct ยีนชนิดหนึ่งคือ C-myeloproliferative leukemia ซึ่งเป็น cellular gene เข้าไปอยู่ในส่วนของ envelop gene region ของไวรัสได้ โปรตีนที่ถูกกำหนดให้สร้างขึ้นโดยยีนดังกล่าวนี้เรียกชื่อว่า **c-myeloproliferative leukemia protein** จากการศึกษาพบว่ายีนนี้มีส่วนเหมือนกับยีนกำหนดการสร้าง hematopoietic growth factor receptor และพบว่าหนูที่ขาดยีนนี้จะไม่มีการแสดงออกของ c-myeloproliferative leukemia receptor และทำให้เกิดเลือดต่ำ ปริมาณ megakaryocyte ในไขกระดูกลดน้อยลงด้วย

Cytokines

Cytokines หลายชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาการของ megakaryocyte ทั้งแบบ *in vitro* และ *in vivo* แม้ไม่ใช่หน้าที่เดียวหรือหน้าที่หลักของ cytokine ชนิดนั้นๆ ก็ตาม cytokines บางชนิดทำหน้าที่ เป็น MK-CSF โดยตรง บางชนิดต้องทำงานร่วมกับสารอื่น (synergy) เพื่อให้สามารถทำหน้าที่เป็น CFU-MK ได้ เป็นต้น

1. Interleukin-3 (IL-3)

มีผลมากที่สุดในการกระตุ้นทั้ง BFU-MK และ CFU-MK¹³ ในคนสามารถกระตุ้นการสร้างทั้งเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด แต่ในหนูมีผลกระตุ้นการสร้างเฉพาะเกล็ดเลือด ปัจจุบันมีการสังเคราะห์โปรตีนที่สามารถออกฤทธิ์เหมือน IL-3 แต่มากกว่าถึง 10 เท่าจากการทดลองในหนู เรียกชื่อว่า **SC-55494** แต่ในคนยังไม่มีรายงาน

2. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)

มีผลกระตุ้นแบบ MK-CSF คล้าย IL-3 แต่น้อยกว่ากระตุ้นการสร้างเกล็ดเลือดในสัตว์ทดลอง แต่ไม่มีผลในคน GM-CSF และ IL-3 ออกฤทธิ์ร่วมกันในการกระตุ้น megakaryocyte และการฟื้นตัวของเกล็ดเลือดหลังเคมีบำบัด

แต่ควรให้ร่วมกันเท่านั้น เพราะจากการศึกษาพบว่า การให้ GM-CSF ตามหลัง IL-3 ไม่ให้ผลดีไปกว่าการให้ IL-3 เพียงอย่างเดียว

3. Stem cell factor (SCF) หรือ kit ligand (KL)

การศึกษาพบว่าต้องให้ร่วมกับ GM-CSF หรือ IL-3¹³ จึงจะสามารถเพิ่ม CSA และช่วยเร่งการฟื้นตัวของเกล็ดเลือดหลังรังสีรักษา การใช้ SCF ในคนมีผลเฉพาะต่อ CSA แต่ไม่มีผลเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือด

4. Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 ช่วยเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดในคนและในสัตว์ทดลอง ประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นถ้ากระตุ้นให้มีการสร้าง endogenous IL-6 หรือ IL-3 หรือ GM-CSF¹⁴

5. Interleukin-6 (IL-6)

สร้างจากเซลล์หลายชนิดรวมทั้ง macrophage, stromal cell และ endothelial cell ของ fibroblast นอกจากนี้ megakaryocyte ยังสามารถสร้างได้ทั้ง IL-6 และ IL-6 receptor¹⁵

IL-6 เพิ่มประสิทธิภาพของ IL-3 เพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดโดยทำให้ platelet reactivity เพิ่มขึ้น แต่จากการศึกษาพบว่า IL-6 ไม่ได้ทำงานโดยตรงในการเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือด แต่เป็นผลจากการทำงานร่วมกับสารอื่น IL-6 ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ IL-3 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำงานร่วมกับ IL-3 จะสามารถกระตุ้นการทำงานของ hepatocyte, B cell และ multipotent hematopoietic progenitor ด้วย¹⁵

6. Interleukin-11 (IL-11), Leukemia inhibitory factor (LIF) และ Oncostatin M

มีผลต่อ megakaryocyte คล้าย IL-6 ช่วยเพิ่มจำนวนเกล็ดเลือดและเพิ่ม hepatic acute phase response ตัวรับจำเพาะของสารในกลุ่มนี้มี signal transducing chain เป็น gp130¹⁶ เหมือนกัน IL-11 เมื่อใช้ร่วมกับ IL-3 และ SCF สามารถเสริมฤทธิ์กันในการกระตุ้นการแบ่งตัวของ megakaryocyte progenitor¹⁶

7. Erythropoietin (Epo)

ปกติทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดแดงโดยเข้าจับกับ Epo receptor บน erythroblast แต่ Epo ยังทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ megakaryocyte colony จากการศึกษพบว่า Epo receptor บน megakaryocyte มีจำนวนประมาณ 1 ใน 4 ของที่พบบน erythroblast การใช้ Epo ในการรักษาโรคไตวายเรื้อรังไม่ได้ช่วยเพิ่มเกล็ดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ และในสัตว์ทดลองพบว่า Epo ทำให้เกล็ดเลือดเพิ่มขึ้นชั่วคราว¹⁷

Cytokines อื่น ที่มีผลต่อ megakaryocytes เช่น G-CSF, IL-4, fibroblast growth factor และ IL-7 เป็นต้น แต่ข้อมูลการศึกษายังไม่ชัดเจน สำหรับ cytokines ที่กล่าวมาข้างต้น แม้พบว่ามีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ megakaryocyte ก็ตาม แต่เนื่องจากประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ หากใช้เพื่อการรักษาต้องใช้ในปริมาณมาก และมีข้อเสียเกิดขึ้นจากผลข้างเคียงของ cytokines นั้น ซึ่งมีผลต่อเซลล์ชนิดอื่นด้วย ดังที่กล่าวแล้วว่า cytokines มีได้มีผลต่อ megakaryocyte เพียงชนิดเดียว

Cell-derived regulators of megakaryocytopoiesis

Cell interactions มีส่วนเกี่ยวข้องและมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้าง megakaryocyte นอกจากนี้ นักวิจัยยังเชื่อว่าการที่ cytokines ดังกล่าวข้างต้นทำงานได้น่าจะเป็นผลจากการกระตุ้น accessory cells ชนิดต่างๆ ที่อยู่ใกล้ๆ ไขกระดูกเช่น macrophage ที่พบว่ามีผลต่อ CFU-MK ทั้งในภาวะปกติและผิดปกติ¹⁸ นอกจากนี้ยังมี T cell ซึ่งทำหน้าที่ได้ทั้งกระตุ้นและยับยั้งการสร้าง colony ของ megakaryocyte¹⁹ เพราะ T cell สามารถสร้างและหลั่ง cytokines หลายชนิดเช่น IL-3, GM-CSF, IL-4, IL-6 และ γ -TNF เซลล์อื่นเช่น NK cells สามารถกระตุ้นการสร้าง colony ของ megakaryocyte และหลั่งสารซึ่งมีผลต่อ proliferation และ maturation ของ megakaryocyte เช่นกัน²⁰ และยังเร่งการฟื้นตัวของเกล็ดเลือดในผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไขกระดูกด้วย

มีรายงานถึงปัจจัยเกี่ยวข้องอื่นอีก เช่น adhesion ระหว่าง megakaryocyte, stromal fibroblast และ

activated endothelial cells สามารถเพิ่ม maturation ของ megakaryocyte ได้ด้วย หรือพบว่า IL-1, TNF และ lipopolysaccharide (LPS) สามารถทำให้ endothelial cells สร้างและหลั่ง IL-6 และ GM-CSF²¹ ซึ่งทำให้เกิดภาวะ secondary thrombocytosis ในผู้ป่วยที่มี inflammatory disorders

การยับยั้งพัฒนาการของ megakaryocyte

นอกจากให้ความสนใจต่อการพัฒนา และการแก่ตัวของเกล็ดเลือดและเซลล์ที่เกี่ยวข้อง และนำผลของความรู้มาใช้ในการแพทย์มากมาย เพื่อรักษาความผิดปกติของภาวะเกล็ดเลือดต่ำ นักวิทยาศาสตร์ ยังให้ความสนใจต่อการยับยั้งกระบวนการดังกล่าวด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงกลไกและโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง ด้วยวัตถุประสงค์เดียวกันคือเพื่อควบคุมไม่ให้มีการสร้างเกล็ดเลือดมากเกินไปจนทำให้เกิดพยาธิสภาพเช่น thrombocythemia และ myeloproliferative disease เป็นต้น

จากการศึกษพบว่าโมเลกุลที่สามารถควบคุม และกำหนดพัฒนาการของ megakaryocyte และเซลล์ที่เกี่ยวข้อง โดยมีที่มาสองแหล่งด้วยกันคือ จากเกล็ดเลือดเอง (ได้แก่ 12-17kD glycoprotein,²² transforming growth factor- β (TGF- β) และสารอื่นจาก α -granule) และจากเซลล์อื่น (ได้แก่ α -IFN, γ -IFN และ IL-4)

เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้น จะหลั่ง TGF- β ปริมาณมากจาก α -granule โมเลกุลนี้จัดเป็น inhibitory cytokine จากการศึกษในหลอดทดลองพบว่า สามารถยับยั้งการแบ่งตัวการเจริญเติบโตของ megakaryocyte ได้ และทำให้เกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำเมื่อนำเข้าสู่ในสัตว์ทดลอง นอกจาก TGF- β ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักที่พบมากที่สุดแล้วยังมีสารชนิดอื่นที่หลั่งจาก α -granule เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นได้แก่ platelet factor-4 (PF-4), β -thromboglobulin และ connective tissue-activating peptide (CTAP III)²³ สารเหล่านี้ช่วยยับยั้ง maturation ของ megakaryocyte แม้ว่าผลยับยั้ง proliferation น้อยกว่าผลยับยั้ง maturation²³

สำหรับสารอื่นที่มีผลยับยั้งการเจริญของ megakaryocyte แต่หลังจากเซลล์อื่นๆ ได้แก่ α -IFN ซึ่งยับยั้ง

การทำงานของ CFU-MK โดยตรง และมีการนำมาใช้รักษาผู้ป่วยภาวะ myeloproliferative disease ส่วน γ -IFN ช่วยยับยั้งการทำงานของเซลล์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับ megakaryocytopoiesis สำหรับ IL-4 มีผลยับยั้งการสร้าง colony ของ megakaryocyte และการแบ่งตัวในระยะแรก ของ megakaryocyte progenitor cell²⁴

Platelet production and release

มีรายงานว่า megakaryocyte หนึ่งเซลล์สามารถสร้างเกล็ดเลือดได้ประมาณ 1,000-5,000 ตัว และมีอัตราการสร้างแต่ละวันได้ 35,000 ตัว/ลบ.มม. ของเลือดครบส่วน โดยพบว่าสร้างได้มากขึ้นกว่าปกติถึงแปดเท่าหากร่างกายมีระดับเกล็ดเลือดลดลง หรือต้องการเกล็ดเลือดมากขึ้น²⁵ เมื่อ megakaryocyte มีการแก่ตัวเต็มที่ สามารถปล่อยเกล็ดเลือดได้ จะเคลื่อนตัวไปยังผนัง marrow sinus และปล่อยเกล็ดเลือดออกไป วิธีการปล่อยเกล็ดเลือดจากไขกระดูกสู่กระแสเลือดเป็นอย่างไรนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการเสนอทฤษฎีไว้เป็น 3 แบบ¹ คือ Platelet budding, Cytoplasmic fragmentation via DMS และ Proplatelet formation แต่ละทฤษฎีมีการศึกษาและพบหลักฐานที่อธิบายได้ ดังนี้

1. Platelet budding อาศัยหลักฐานจาก scanning electron microscope พบลักษณะของเกล็ดเลือดมีส่วน cytoplasm ยื่นออกจากเซลล์ อย่างไรก็ตามส่วนที่ยื่นออกมานั้นมีลักษณะคล้าย pseudopod และไม่พบส่วนประกอบของเซลล์ภายในส่วนยื่นแต่อย่างใด ทฤษฎีนี้จึงไม่ค่อยได้รับการยอมรับนักเพราะเหตุผลอธิบายไม่เพียงพอ²⁶

2. Cytoplasmic fragmentation via DMS ทฤษฎีนี้อธิบายว่า megakaryocyte ตัวแก่จะเริ่มเกิด invagination ของ plasma membrane เข้าไปภายในเซลล์ตามแนว DMS และเกิด tubular membrane ขึ้นพร้อมๆ กัน ทำให้มีการแบ่ง megakaryocytes ออกเป็นส่วนๆ และมีองค์ประกอบของ cell organelles เหมือนๆ กันซึ่ง

เรียกว่า Territory แต่ละส่วนเชื่อมโยงกับ plasma membrane ด้วย tubular membrane²⁷

3. Proplatelet formation ทฤษฎีนี้เริ่มต้นโดย Becker และ De Bruyn ซึ่งเสนอว่า megakaryocyte ยื่นส่วน cytoplasm ออกเป็น pseudopod ขนาดยาวและหลังจากนั้นแตกออกเป็นเกล็ดเลือดเล็กๆ²⁸ ทฤษฎีดังกล่าวยังยืนยันอยู่บนพื้นฐานว่าต้องเกิดร่วมกับ DMS ด้วยต่อมา Radley และ Haller²⁹ ได้พัฒนาแนวความคิดนี้และเรียกว่า "Flow Model" ซึ่งกล่าวว่าเกล็ดเลือดถูกสร้างขึ้นจากส่วนปลายของ proplatelet pseudopod โดยไม่เกี่ยวข้องหรือต่อเนื่องจากการเกิด DMS และยังอธิบายเพิ่มจากหลักฐานทาง scanning electron microscope ว่า DMS ทำหน้าที่เพียงการแบ่งส่วนของ cytoplasm ด้วยกระบวนการ invagination ของ plasma membrane เท่านั้น

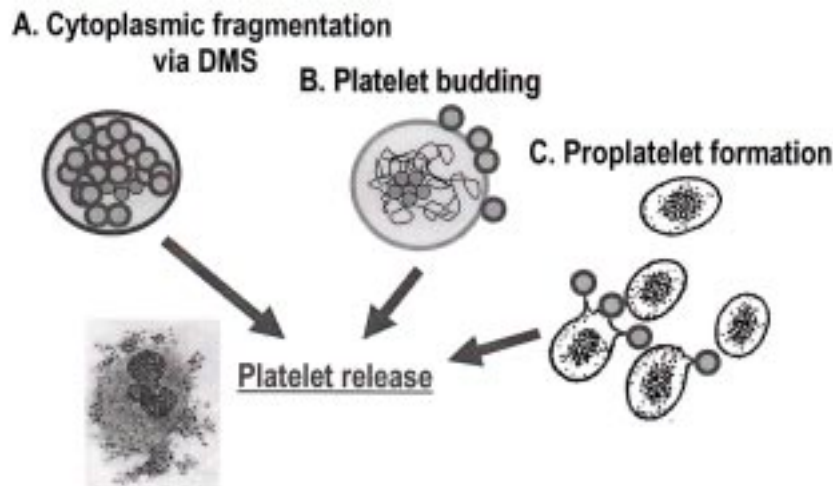
ทฤษฎี Proplatelet formation ได้รับการยอมรับมากกว่าทฤษฎีอื่นเพราะมีหลักฐานยืนยันชัดเจนในหลายกรณีได้แก่

1. พบ proplatelet ได้ทั้งในตัวอย่างเลือดและในเซลล์เพาะเลี้ยง และเกล็ดเลือดที่เกิดขึ้นจากการเกิด fragmentation ของ proplatelet มีโครงสร้างและสามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเกล็ดเลือดที่พบในกระแสเลือด³⁰

2. พบ proplatelet ได้ในตัวอย่างเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดทั้งสุนัข วัว หนูทดลอง (mice, rat, guinea pig) และคน³¹

3. พบ proplatelet ยื่นออกจาก megakaryocyte ในไขกระดูกผ่าน sinusoid ของผนังหลอดเลือด จึงมีการตั้งสมมุติฐานว่าเกล็ดเลือดที่พบในกระแสเลือดเกิดจากกระบวนการนี้ กล่าวคือ megakaryocyte ยื่น pseudopod ออกจากไขกระดูกผ่าน sinusoid และแตกส่วนปลายของ pseudopod ออกเป็นเกล็ดเลือดออกสู่กระแสเลือด³²

4. หนูทดลองที่ขาดยีนกำหนดการสร้าง hematopoietic transcription factor ไม่สามารถผลิต proplatelet และหนูเกิดภาวะเกล็ดเลือดต่ำ³³



รูปที่ 2 Theory of platelet formation

แหล่งผลิตเกล็ดเลือด (Sites of platelet production)

หลายคนเชื่อว่าเกล็ดเลือดถูกสร้างและปล่อยจากไขกระดูก เช่นเดียวกับเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว แต่มีหลักฐานเชื่อว่าการสร้างเกล็ดเลือดส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในปอดที่บริเวณ dichotomous branches ของหลอดเลือดเล็กๆ ด้วยเช่นกัน โดยมีกลไกคือ megakaryocyte ถูกปล่อยจากไขกระดูกเข้าสู่หลอดเลือดดำ จากนั้นมีการแตกของ cytoplasm ออกเป็นเกล็ดเลือดเล็กๆ ภายในหลอดเลือดนั้นด้วยแรงกายภาพ แต่ละแนวความคิดมีหลักฐานสนับสนุนดังนี้

1. เกล็ดเลือดถูกสร้างในไขกระดูก มีหลักฐานจากการใช้ scanning electron microscope³² พบ proplatelet ในไขกระดูกและพบลักษณะของ beaded-pseudopod ยื่นจาก proplatelet ผ่าน sinusoid ของ endothelial lining

2. เกล็ดเลือดถูกสร้างในกระแสเลือดกล่าวว่า megakaryocyte fragment จากไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด และมีการพัฒนาเป็นเกล็ดเลือดสมบูรณ์ในระหว่างที่อยู่ในกระแสเลือด³⁴ หลักฐานที่สนับสนุนความคิดนี้คือการตรวจพบ megakaryocytes และ megakaryocytes ที่กำลังอยู่ในกระบวนการเกิด proplatelet ในกระแสเลือด โดยพบประมาณ 5-20% ของจำนวนเกล็ดเลือดที่พบในกระแสเลือดทั้งหมด³⁴ การศึกษา megakaryocyte frag-

ment ที่แยกจาก platelet rich plasma พบว่าสามารถนำมาเพาะเลี้ยงและมีการพัฒนารูปร่างในลักษณะต่างๆ จนเป็นเกล็ดเลือดได้เช่นเดียวกับ proplatelet และยังทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับเกล็ดเลือดที่พบในกระแสเลือดปกติ³⁴ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์ megakaryocytes ของคนและหนูทดลอง พบว่าสามารถพัฒนาเป็นเกล็ดเลือดที่มีรูปร่างและทำหน้าที่ได้ตามปกติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการพัฒนาและสร้างเกล็ดเลือดไม่จำเป็นต้องเกิดขึ้นในไขกระดูกเท่านั้น³⁵

3. เกล็ดเลือดถูกสร้างในปอด เนื่องจากตรวจพบ megakaryocytes ในหลอดเลือดที่ปอด ที่น่าสนใจคือพบ megakaryocyte ใน pulmonary vein มากกว่าที่พบใน pulmonary artery ทำให้เชื่อว่าน่าจะมีการพัฒนาและสร้างเกล็ดเลือดได้ที่ปอดเช่นกัน โดย Aschoff ให้ข้อคิดว่า ปริมาณ megakaryocytes จำนวนมากที่ออกสู่กระแสเลือด บางส่วนอาจถูกกักไว้ในบริเวณปอดเนื่องจากมีขนาดใหญ่ จึงสะสมรวมตัวกันมากที่บริเวณ capillary และมีการสร้างเกล็ดเลือดในบริเวณดังกล่าว หลักฐานยืนยันคือ

- การพบ megakaryocyte ตัวแก่และนิวเคลียสในหลอดเลือดดำทั้งระบบ central venous circulation และภายในปอด
- การพบ megakaryocyte ใน pulmonary

artery มากกว่าใน aorta ในผู้ป่วยที่อยู่ในระหว่างการรักษาด้วยวิธี cardiac catheterization

- การพบ megakaryocyte มากขึ้นเป็นลำดับใน pulmonary circulation

- การคำนวณทางคณิตศาสตร์พบว่าจำนวนและขนาดของเกล็ดเลือดมีความแตกต่างกัน (platelet heterogeneity) ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยทฤษฎีนี้ (ปกติเกล็ดเลือดขนาดใหญ่มีประมาณ 10% ของเกล็ดเลือดทั้งหมดในกระแสเลือด)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาใดๆ ที่บ่งชี้ชัดว่าเกล็ดเลือดถูกสร้างที่ปอดเท่านั้น และด้วยการค้นพบ

หลักฐานข้างต้น จึงเป็นไปได้ว่าการสร้างเกล็ดเลือดอาจเกิดได้ทั้งที่ปอด ไชกระดูก และภายในกระแสเลือดร่วมกัน

หน้าที่และบทบาทสำคัญของเกล็ดเลือดในกระบวนการห้ามเลือด

เกล็ดเลือดมีหน้าที่สำคัญคือการห้ามเลือด โดยเฉพาะในหลอดเลือดขนาดเล็ก และช่วยคงสภาวะของหลอดเลือดให้ปกติ หน้าที่รองคือช่วยการแข็งตัวของเลือด โดยทำงานร่วมกับ coagulation proteins ต่างๆ พยาธิสภาพหลายอย่างเป็นผลสืบเนื่องจากการทำงานของเกล็ดเลือด ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3³⁶

ตารางที่ 2 บทบาทของเกล็ดเลือดในกระบวนการทางสรีรวิทยาของร่างกาย

กระบวนการ	บทบาทของเกล็ดเลือดในกระบวนการ
Hemostasis	- เกล็ดเลือดเกาะติดผนังหลอดเลือดในบริเวณนี้ขาด - เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มกันเป็นจำนวนมาก ซึ่งเกิดขึ้นจากการที่เกล็ดเลือดช่วยปล่อย procoagulant proteins และ thrombin - Actomyosin contraction ภายในเกล็ดเลือด ทำให้เกิดการหดตัวของก้อน fibrin-cell mass
Endothelial support function	- เกล็ดเลือดกระตุ้นการสร้างเซลล์ผนังหลอดเลือดที่บริเวณนี้ขาดให้กลับสู่สภาพเดิม - เกล็ดเลือดสร้างและหลั่ง growth factor เช่น PDGF
Detoxifying role	- เกล็ดเลือดช่วย uptake และนำพา serotonin (5HT) จากแหล่งสร้างไปยังบริเวณที่ต้องการ เพื่อให้เกิดการควบคุมการหดตัวของหลอดเลือดเป็นปกติ ส่งผลในการควบคุม cardiovascular hemodynamics และ peristalsis
Phagocytosis	- เกล็ดเลือดสามารถจับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ได้ทั้งแบบ phagocytosis และ pinocytosis แต่ยังไม่ทราบบทบาทนี้ว่าสำคัญหรือไม่ในระบบหมุนเวียนของเลือดปกติ
Cytocidal	- เกล็ดเลือดมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการตายของเซลล์ผ่าน CD23 ซึ่งเป็น low affinity IgE receptor

ตารางที่ 3 บทบาทของเกล็ดเลือดในกระบวนการเกิดพยาธิสภาพของร่างกาย

กระบวนการ	บทบาทของเกล็ดเลือดในกระบวนการ
Inflammatory states and wound healing	- เกล็ดเลือดหลังสารตัวกลางที่มีผลโดยตรงในการเพิ่ม vascular permeability (PGE₂, HETE, cationic proteins) และกระตุ้น mast cells ให้หลั่ง histamine ซึ่งมีผลเช่นเดียวกัน - แกรนูลของเกล็ดเลือดหลังสารประกอบหลายชนิดที่มีสามารถในการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ leukocyte chemotactic factors, protease และ glycosidase ชนิดต่างๆ
Transplant rejection	- การเกิด immune complex ของแอนติเจนและแอนติบอดี ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและอุดตันหลอดเลือดขนาดเล็กที่หล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะ ทำให้เกิด necrosis และ rejection ในที่สุด - การให้สารประเภท anti-platelet จะช่วยส่งเสริมให้เนื้อเยื่อและอวัยวะอยู่รอดได้นานขึ้น
Thrombosis and down stream embolism	- Platelet-endothelial cell interaction ที่เกิดขึ้นเมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือด หากมากเกินไปจะทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดได้ - หลังกระบวนการ fibrinolysis จะเกิดก้อน thrombus จำนวนมาก ทำให้เกิด emboli อุดตันในอวัยวะต่างๆ ได้ เช่น ปอด สมอง
Stenosis	- เกล็ดเลือดจำนวนมากที่เกาะกลุ่มกันในบริเวณฉีกขาดของหลอดเลือด ทำให้มีปริมาณ PDGF ในบริเวณดังกล่าวสูง มีผลกระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ยิ่งทำให้เกิดการอุดตันมากขึ้น
Cancer metastasis	- Platelet-tumor cell interaction ทำให้เกิดการเกาะติดของ tumor cells กับผนังหลอดเลือด ซึ่งช่วยทำให้ tumor cells ลอดผ่านผนังหลอดเลือดไปยังเนื้อเยื่อได้ - เกล็ดเลือดเกาะติดกับ tumor cells ช่วยทำให้รอดพ้นจากการกำจัดของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ - เกล็ดเลือดสามารถสร้างและหลั่งสารตัวกลางที่ช่วยการสร้างหลอดเลือดใหม่ให้แก่ tumor cells (platelet-growth factors, angiogenesis-promoting agents)

เห็นได้ว่าเกล็ดเลือดมีบทบาทสำคัญมากมาย ไม่เพียงแต่การห้ามเลือดและการแข็งตัวของเลือดเท่านั้น เกล็ดเลือดยังทำงานสัมพันธ์กับโปรตีนเพียงสองแหล่งเท่านั้นคือ โปรตีนบนผนังหลอดเลือด และโปรตีนในกระบวนการแข็งตัวของเลือด โดยมีรายละเอียดดังนี้

ความสัมพันธ์ระหว่างเกล็ดเลือดและผนังหลอดเลือด

เกล็ดเลือดมีลักษณะเหมือนเซลล์เม็ดเลือดทั่วไปคือ ไม่เกาะติดกันเอง หรือเกาะติดผนังหลอดเลือด เพราะต่างมีประจุลบเหมือนกันจึงผลักกัน³⁷ ลักษณะเช่นนี้ทำให้ในภาวะปกติไม่เกิดการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนผนังหลอดเลือด จะเกิดการเกาะติดเมื่อหลอดเลือดมีการขยายตัวจนชั้น basement membrane เผยออกมา ปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นชั่วคราว เมื่อใดที่หลอดเลือดหดตัว เกล็ดเลือดจะหลุดออกไปเอง ซึ่งไม่ถือเป็นพยาธิสภาพ เหตุผลอื่นที่ทำให้เกล็ดเลือดไม่เกาะติดผนังหลอดเลือดในภาวะปกติ เป็นผลจากกลไกของเซลล์ผนังหลอดเลือดเอง ซึ่งอธิบายได้หลายกรณีดังนี้³⁸⁻⁴⁰

1. Endothelium cell สามารถสร้างโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด ที่สามารถยับยั้งการเกาะติด หรือลดการกระตุ้นเกล็ดเลือด โปรตีนต่างๆ ได้แก่

ADPase ช่วยทำลาย ADP ที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นเกล็ดเลือด

Prostaglandin I₂ (PGI₂) ช่วยเพิ่มระดับ cAMP ซึ่งเป็นการยับยั้งทั้ง adhesion และ aggregation ของเกล็ดเลือด

Endothelium-derived relaxing factor (EDRF หรือ Nitric oxide) เช่นเดียวกับ PGI₂ คือเพิ่มระดับ cAMP ช่วยยับยั้งการกระตุ้นเกล็ดเลือด

2. ชั้น intima ของผนังหลอดเลือดประกอบด้วย heparan sulfate molecules ซึ่งสามารถกระตุ้น antithrombin III และเร่ง neutralization ของโปรตีน throm-

bin และ thrombomodulin ผลคือทำให้เกิดการทำลาย FVa และ FVIIIa ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด

3. Endothelium cell สามารถหลั่ง plasminogen activator ในการย่อยสลาย fibrin

เห็นได้ว่าในสภาวะปกติแล้วเกล็ดเลือดจะไม่เกาะติดกับผนังหลอดเลือดได้เลย แต่เมื่อไรก็ตามที่เกิดการฉีกขาดของหลอดเลือดถึงชั้น subendothelium (ซึ่งมีประจุบวก) เกล็ดเลือดจะเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนในชั้น subendothelium ตามด้วยการเกิด adhesion/aggregation ในเบื้องต้น จากนั้นเกิด fibrin เคลือบที่ขอบนอกของเกล็ดเลือดที่เกาะกลุ่มนี้ เรียกว่า **white thrombus** ลักษณะนี้ช่วยไม่ให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มกันมากเกินไป จนอุดตันหลอดเลือด หลังจากนั้นเซลล์ผนังหลอดเลือดจะแบ่งตัวคลุม white thrombus จนในที่สุด endothelium เชื่อมต่อกันอย่างเต็มและแผลที่เกิดขึ้นหายไป การแบ่งตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเป็นผลจาก platelet-derived growth factor ที่หลังจากเกล็ดเลือดเมื่อถูกกระตุ้นนั่นเอง ปรากฏการณ์เช่นนี้หากเกิดซ้ำบ่อยๆ จะมีผลเสียคือเกิด atherosclerosis และ microembolization ตามมาได้

ความสัมพันธ์ระหว่างเกล็ดเลือดและโปรตีนในกระบวนการแข็งตัวของเลือด⁴²

เกล็ดเลือดจะเข้ามามีบทบาทต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือด (platelet coagulant activity) เมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือดมากจนทำให้เกิดรูรั่วของผนังหลอดเลือด โดยเกล็ดเลือดทำหน้าที่อุดรูรั่วซึ่งเรียกว่า Hemostatic plug ซึ่งการที่เกล็ดเลือดจะทำหน้าที่นี้ได้ เกล็ดเลือดต้องถูกกระตุ้นเสียก่อนจากสารกระตุ้น (platelet activator, ตารางที่ 4)⁴² ส่งผลทำให้เกล็ดเลือดเกิดกระบวนการต่างๆ ต่อเนื่องกัน ได้แก่ adhesion, aggregation, release และ fibrin formation สารกระตุ้นเหล่านี้พบได้ที่บริเวณฉีกขาดของหลอดเลือด

ตารางที่ 4 Platelet activator ซึ่งพบได้ในบริเวณที่เกิดรอยร้าวของหลอดเลือด

ระดับของความแรง (Potency)	ชื่อของสารกระตุ้นเกล็ดเลือดในกลุ่ม
Strong	1. Thrombin 2. High concentration of collagen 3. Trypsin 4. A-23187
Intermediate	1. Thromboxane A₂ 2. Prostaglandin H₂
Weak	1. ADP 2. Epinephrine 3. Serotonin 4. Platelet-activating factor 5. Vasopressin
Other (unknown)	1. Shear 2. Thrombolytic agents (plasmin) 3. Agglutinating agents (Ristocetin, Bovine factor VIII, Polylysine, Antiplatelet antibodies) 4. Aggregated globulin

การเกาะติดของเกล็ดเลือดกับผนังหลอดเลือด (platelet adhesion)⁴²

เป็นเหตุการณ์แรกที่สุดที่เกิดขึ้นในกระบวนการห้ามเลือด เมื่อหลอดเลือดฉีกขาดลึกจนถึงชั้น subendothelium ซึ่งมีประจุบวก เกล็ดเลือดที่เคลื่อนที่ผ่านจะเข้ามาเกาะติดโดยความแตกต่างของประจุก่อนเป็นครั้งแรก จากนั้นจึงสานต่อการเกาะติดโดยอาศัยปฏิสัมพันธ์กับ adhesion molecules ซึ่งสร้างโดย subendothelium cell เกล็ดเลือดในภาวะปกติสามารถมีปฏิสัมพันธ์ได้กับพื้นผิวใดๆ ได้ผ่านทาง fibrinogen หรือ vWF แต่จะเพิ่มความสามารถขึ้นอีกเมื่อถูกกระตุ้น โดยสามารถจับกับพื้นผิวใดๆ ผ่านทาง fibronectin และ vitronectin เพิ่มขึ้นนอกเหนือจากโปรตีนสองชนิดแรก

การเกาะติดผนังหลอดเลือดของเกล็ดเลือดจึงเกิดได้ผ่านทางโมเลกุลเหล่านี้เมื่อมีการฉีกขาดของหลอดเลือด เซลล์ในชั้น subendothelium สามารถสร้างและหลั่งสารตัวกลางซึ่งมีส่วนช่วยการเกาะติดของเกล็ดเลือด (ตารางที่ 5)⁴² ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นอาศัยไกลโคโปรตีนสำคัญสองชนิดบนผิวเกล็ดเลือดคือ glycoprotein IIb/IIIa และ glycoprotein Ib/IX/V ตามลำดับ เมื่อเกาะติดแล้วจะเกิดการแผ่ตัวออกโดยอาศัยกระบวนการ cytoskeleton reorganization และ Tyrosine phosphorylation ภายในเกล็ดเลือดเอง มีการปล่อยสารสำคัญ เช่น ADP (Release reaction) กระตุ้นเกล็ดเลือดอื่นให้มาเกาะติดเพิ่มขึ้น

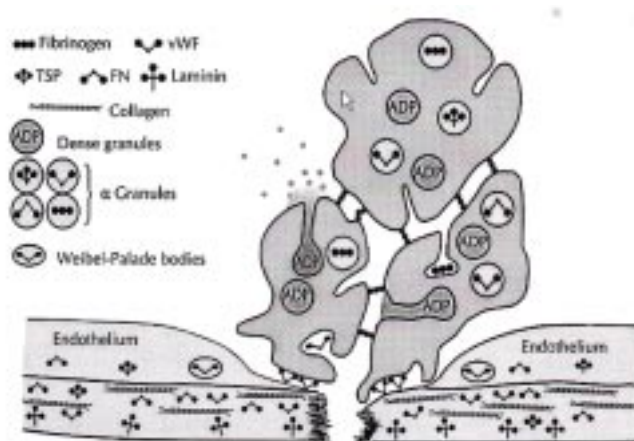
ตารางที่ 5 สารช่วยการห้ามเลือดที่อยู่ในผนังหลอดเลือดชั้นต่าง ๆ

ชั้นของผนังหลอดเลือด	ชนิดของสารช่วยห้ามเลือด
Subendothelium	- von Willebrand factor - Fibrinogen (Fibrin) - Collagen (Type IV, V, VI) - Fibrinogen - Thrombospondin - Laminin - Vitronectin - Tissue factor
Media	- Collagen (Type I, III)
Adventitia	- Collagen (Type I, III) - Tissue factor

การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation)⁴³

เป็นขั้นตอนที่สองหลังจากมีการเกาะติดของเกล็ดเลือด การเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในขั้นตอนนี้เกิดขึ้นได้เมื่อเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นแล้วเท่านั้น (ด้วยสารกระตุ้นดังแสดงในตารางที่ 4) สิ่งสำคัญสำหรับการเกาะกลุ่มกันเองของเกล็ดเลือดคือ ต้องมี extracellular calcium ion และ Fibrinogen กระบวนการนี้อาศัยพลังงาน ATP จากเกล็ดเลือด หรือกล่าวได้ว่าเกิดได้เฉพาะกับเกล็ดเลือดที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น กระบวนการนี้

แบ่งเป็น 2 ระยะคือ primary aggregation ซึ่งเป็นการเกาะกลุ่มแบบ reversible เกิดจากการกระตุ้นของ platelet activator และยังไม่มีการปล่อยสารใดๆ จากเกล็ดเลือด จากนั้นเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นจะปล่อยสารตัวกลางที่สำคัญคือ ADP ทำให้เกิด secondary aggregation ซึ่งเกิดแบบ irreversible กลไกทั่วไปคือ calcium ion เคลื่อนเข้าสู่เซลล์เกล็ดเลือด เกิดการกระตุ้นเกล็ดเลือดขึ้นโดยอาศัย ATP ภายในเกล็ดเลือด มีผลทำให้โมเลกุลบนผิวเซลล์คือ gpIIb/IIIa เข้าจับกับ fibrinogen และเกิดการเกาะกลุ่มกันระหว่างเกล็ดเลือด



รูปที่ 3 การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดภายหลังการถูกกระตุ้น

การปล่อยสารตัวกลางจากเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (release reaction)

เป็นการหลั่งสารตัวกลางซึ่งปกติอยู่ใน storage granules ออกสู่ภายนอกเซลล์ด้วยการ exocytosis หลังจากเกล็ดเลือดถูกกระตุ้นแล้ว ระยะนี้กินเวลาประมาณ 10-120 วินาทีขึ้นกับความแรงของ platelet activator⁴¹ สารที่หลั่งมีผลโดยตรงต่อเกล็ดเลือดเอง และเซลล์หลายชนิด สารบางชนิดยังถูกเปลี่ยนโครงสร้างให้สามารถทำหน้าที่อื่นในพลาสมา หรือบนผิวเซลล์ได้เช่นกัน ชนิดและปริมาณของสารหลั่งแปรผันตรงกับชนิดและความแรงของสารกระตุ้น เช่น acid hydrolase จาก lysosome ต้องการสารกระตุ้นขนาดสูง และการหลั่งช้ากว่าสารหลั่งจาก dense granule สารกระตุ้นเกล็ดเลือดที่มีความแรงสามารถทำให้มีการหลั่งของสารจากแกรนูลทั้ง 3 ชนิด (α -granules, dense granules และ lysosome) ได้แก่ thrombin, collagen และ cationophore A-23187 ส่วน ADP, epinephrine และ TXA_2 สามารถกระตุ้นการหลั่งของสารจาก α -granules และ dense granules เท่านั้น⁴¹ สารกระตุ้นเกล็ดเลือดทำให้เกิดการตอบสนองของเกล็ดเลือดคือ การเพิ่มปริมาณ cytosolic calcium ion การเคลื่อนย้าย calcium ion จาก membrane storage ซึ่งมีผลต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการหดตัวของเกล็ดเลือด การยื่น pseudopod หรือ filopodia การรวมตัวของแกรนูลตรงกลางเซลล์ การเชื่อมกันของแกรนูลกับ surface-connected OCS และการหลั่งสารในแกรนูลออกนอกเซลล์ ปรากฏการณ์ทั้งหมดส่งผลให้เกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เกล็ดเลือดมีการจับกลุ่มกันและมีการปล่อย TXA_2 การตอบสนองของเกล็ดเลือดต่อสารกระตุ้นมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณ ATP ภายในเกล็ดเลือดด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Gewirtz AM. Development biology of megakaryocytes and platelets. Current opinion Hematol 1993; 256
2. Angchaisiri P, Carlson PL, Day EB, Dessypris EN. Endoreplication proceeds synchronously with replication in developing megakaryocytes *in vitro*. Exp Hematol 1994; 22: 546
3. Williams N, Levine RF. The origin, development and regulation of megakaryocytes. Br J Haematol 1982; 52: 173
4. Behnke O. An electron microscope study of megakaryocytes on the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and platelet surface coat. J Ultrastruct Res 1986; 24: 412
5. Thompson CB, Jakubowski JA. The pathophysiology and clinical relevance of platelet heterogeneity. Blood 1988; 72: 1
6. Murphy MJ Jr. Megakaryocyte colony-stimulating factor and thrombopoiesis. Hematol/Oncol Clin North Am 1989; 3: 465
7. Mazur EM, de Alarcon P, South K, Miceli L. Human serum megakaryocytic colony-stimulating activity increases in response to intensive cytotoxic chemotherapy. Exp Hematol 1984; 12: 624
8. McDonald TP, Clift R, Cottrell M. A four-step procedure for the purification of thrombopoietin. Exp Hematol 1989; 17: 865
9. Tayrien G, Rosenberg RD. Purification and properties of a megakaryocyte stimulating factor present both in the serum-free conditioned medium of human embryonic kidney cells and in the thrombocytopenic plasma. J Biol Chem 1987; 262: 3262
10. Gurney AL, Kuang WJ, Xie MH, et al. genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. Blood 1995; 85: 981
11. Debili N, Wending F, Cosman D, et al. The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. Blood 1995; 85: 391
12. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Throm-

- bopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increase megakaryocyte ploidy *in vitro*. Blood 1995; 85: 1719
13. Avraham H, Vannier E, Cowley S, et al. Effects of the stem cell factor, c-kit ligand, on human megakaryocytic cells. Blood 1992; 79: 365
 14. Migliaccio G, Magliaccio AR, Adamson JW. In vitro differentiation and proliferation of human hematopoietic progenitors: The effects of interleukin 1 and interleukin 6 are indirectly mediated by production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3. Exp Hematol 1991; 19: 3
 15. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. Blood 1989; 74: 1
 16. Angchaisuksiri P, Carlson PL, Day RB, Dessypris EN. Interleukin-11 indirectly induces proliferation and endomitosis of immature human megakaryocytes in vitro. Blood 1994; 84(suppl): 683a
 17. Fraser JK, Lin FK, Berridge MV. Expression of high affinity receptors for erythropoietin on human bone marrow cells and on the human erythroleukemia cell HEL. Exp Hematol 1988; 16: 836
 18. Gewirtz AM, Sacchetti MK, Bien R, Barry WE. Cell-mediated suppression of megakaryocytopoiesis in acquired amegakaryocytic thrombocytopenic purpura. Blood 1986; 68: 619
 19. Geissler D, Konwalinka G, Peschel C, et al. A regulatory role of activated T lymphocyte on human megakaryocytopoiesis in vitro. Br J Haematol 1985; 60: 233
 20. Gewirtz AM, Xu WY, Mangan KF. Role of natural killer cells in comparison with T lymphocytes and monocytes, in the regulation of normal human megakaryocytopoiesis *in vitro*. J Immunol 1987; 139: 2915
 21. Avraham H, Cowly S, Chi SY, et al. Characterization of adhesive interaction between human endothelial cells and megakaryocytes. J Clin Invest 1993; 91: 2378
 22. Dessypris EN, Gleaton JH, Sawyer ST, Amstrong OL. Suppression of maturation of megakaryocyte colony-forming unit *in vitro* by a platelet released glycoprotein. J Cell Physiol 1987; 130: 361
 23. Han ZC, Bellucci S, Walz A, et al. Negative regulation of megakaryocytopoiesis by human platelet factor 4 (PF4) and connective tissue-activating peptide (CTAP-III). Int J Cell Cloning 1990; 8: 253
 24. Sonoda Y, Kuzuyama Y, Tanaka S, et al. Human interleukin-4 inhibits proliferation of megakaryocyte progenitor cells in culture. Blood 1993; 81: 624
 25. Harker LA. Kinetics of thrombopoiesis. J Clin Invest 1969; 47: 458
 26. Ihzuni T, Hattori A, Sanada M and Muta M. Megakaryocyte and platelet formation: a scanning electron microscope study in mouse spleen. Arch Histol Japan 1977; 40: 305
 27. Shaklai M and Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: A membrane reorganization process. J Ultrastruct Research 1978; 62: 270
 28. Becker RP and 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: 1046
 29. Radley JM and Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a

- misnomer? *Blood* 1982; 60: 213
30. Choi E, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC and Hunt P. Platelet generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood* 1995; 85: 402
31. Handagama P, Feldman B, Jain N, Farver T and Kono C. In vitro platelet release by rat megakaryocytes: Effect of metabolic inhibitors and cytoskeletal disrupting agents. *Am J Vet Research* 1987; 48: 1142
32. Lichtman M, Chamberlain J, Simon W and Santillo P. Parasinusoidal location of megakaryocytes in marrow: a determinant of platelet release. *Am J Hematol* 1978; 4: 303
33. Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris C., et al. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocytes. *Cell* 1995; 16: 3965
34. Behnke O and Forer A. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis take place in the blood stream. *Eur J Hematol* 1998; 60: 3
35. Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani R and Arakawa T. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999; 147: 1299
36. Crawford N, Scrutter MC. Biochemistry of blood platelet. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. Hemostasis and thrombosis. 3rd Edition. Edinberg: Churchill Livingstone, 1994: 89
37. Schfer AI. The platelet life cycle: Normal function and quantitative disorders In: Handin RI, Lux SE, Stossel TP, Eds. Blood principles and practice of hematology. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1995: 1095
38. Wilson PD, Lieberman GE, Peters TJ. Ultrastructural localization of adenosine diphosphatase activity in cultured aortic endothelial cells. *Histochem J* 1982; 14: 215
39. Adelman B, Stemerman MB, Mennell D, et al. The interaction of platelets with aortic subendothelium: Inhibition of adhesion and secretion by prostaglandin I₂. *Blood* 1981; 58: 198
40. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524
41. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Saizman EW (Eds). Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice, 3rd Edition. Philadelphia: Lippincott, 1994: 524
42. Collier BS. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM (Eds). The heart and cardiovascular system. 2nd Edition. New York: Raven, 1991: 219
43. Bennett JS, Shattil SJ. Platelet function. In: Williams W, Beutler E, Erslev A, Lichman M (Eds). Hematology. 4th Edition. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1991: 1233