



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Medicinos studijų programa

Studijų programa (12 fnt)

Vaikų ligų klinika

Katedra ar klinika, institutas (12 fnt)

Deimantė Šukevičiūtė, 6-tas kursas, 14-ta grupė

Studento vardas ir pavardė, kursas, grupė (12 fnt)

VIENTISŪJŲ STUDIJŲ MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

*BAKALAURO ar MAGISTRO ar VIENTISŪJŲ STUDIJŲ MAGISTRO
BAIGIAMASIS DARBAS (12 fnt)*

**Trombopoezės mechanizmas ir vieta normos ir patologijos atveju:
literatūros apžvalga**

Darbo pavadinimas lietuvių kalba (14 fnt)

**Elucidating the Mechanism and Site of Trombopoiesis Under Normal
and Pathologic Circumstances. Literature Review**

Title of the Final thesis in English (14 fnt)

Darbo vadovas

Doc. Dr.Sonata Šaulytė Trakymienė

(pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė)

Katedros ar klinikos vadovas

Prof. Dr. Augustina Jankauskienė

(pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė)

Vilnius, 2025

Studento elektroninio pašto adresas
deimante.sukeviciute@mf.stud.vu.lt

SANTRAUKA

Trombopoezė – tai trombocitų gamybos procesas, priklausantis nuo megakariocitų fiziologijos, mechaninių jėgų ir specifinių anatominių nišų mikroaplinkos. Šios literatūros apžvalgos tikslas yra apibendrinti šiuo metu žinomus duomenis apie pagrindinius trombocitų gamybos mechanizmus, įskaitant paviršinį pumpuravimą, protrombocitų gamybą, demarkacinės membranų sistemos modelį. Taip pat bus aptariami esami duomenys apie trombopoezės vietas: kaulų čiulpus, kepenis, blužnį, bei plaučius. Galiausiai, apžvalgoje bus nagrinėjami fiziologinės ir patologinės trombopoezės skirtumai, ypatingą dėmesį skiriant neatsakytiems tyrimų klausimams ir būsimų tyrimų kryptims.

ABSTRACT

Thrombopoiesis is a dynamic and multifaceted process governed by a combination of megakaryocyte physiology, mechanical forces, and the microenvironment of specific anatomical niches. This literature review aims to synthesise current evidence pertaining to the process of thrombopoiesis, including surface budding, the proplatelet model, and the demarcation membrane system model. Furthermore, the review discusses existing data regarding the anatomical sites of thrombopoiesis: the bone marrow, liver, spleen, and lungs. Lastly, it examines distinctions between physiological and pathological thrombopoiesis with particular emphasis on unresolved research questions and future research perspectives.

Raktažodžiai/Key terms: trombopoezė/thrombopoiesis; megakariocitas/megakaryocyte; protrombocitas/proplatelet; megakariopoezė/megakaryopoiesis

TURINYS:

1. Santrupos	3
2. Įvadas ir tikslai	5
3. Darbo metodika	5
4. Megakariocitai	6
4.1 Nuo kamieninių ląstelių iki megakariocitų	
4.2 Megakariocitų fiziologijos apžvalga	

5. Trombopoetinas	9
5.1 Trombopoetino fiziologija	
5.2 Trombopoetino klinikinė reikšmė	
6. Megakariopoezė	12
6.1 Endomitozė ir poliploidija	
6.2 Megakariocitų citoplazminiai pokyčiai ir demarkacinė membraninė sistema	
6.3 Megakariopoezės reguliavimas	
7. Trombocitai	14
7.1 Trombocitų fiziologija ir morfologija	
7.2 Retikuluoti trombocitai	
7.3 Trombocitų funkcijos apžvalga	
8. Trombopoezės mechanizmo teorijos	18
8.1 Paviršinio pumpuravimo teorija	
8.2 Demarkacinės membraninės sistemos fragmenacijos teorija	
8.3 Protrombocito teorija	
8.4 Trombopoezės modulatoriai	
9. Trombopoezės vietos	22
9.1 Kaulų čiulpai ir perivaskulinis sinusoidas	
9.2 Ekstramedulinės hemopoezės aktyvumas blužnyje	
9.3 Ekstramedulinės hemopoezės aktyvumas kepenyse	
10. Trombopoezė plaučiuose	27
10.1 Istorinė apžvalga	
10.2 Hematopoetinės kamieninės ląstelės ir megakariocitai plaučiuose	
10.3 Plaučių kapiliarai kaip trombopoezės vieta	
10.4 Plaučiai kaip pagrindinė trombopoezės vieta	
10.5 Plaučiuose vykstančios trombopoezės reikšmingumas	
11. Diskusija ir išvados	32
12. Šaltiniai	34

1. SANTRUPOS

ADAMTS13 – Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13

AKT – Rho family alpha serine/threonine-protein kinase

ATP – Adenosine triphosphate

C-MPL – Myeloproliferative leukaemia protein

circRNR – Circular ribonucleic acid

CLCX12 – CXC motif chemokine ligand 12

CREB – cAMP response element-binding protein

CXCL4 – Chemokine ligand 4

CXCR4 – CXC chemokine receptor type 4

DIK – disseminated intravascular coagulation; diseminuota intravaskulinė koaguliacija

DLL-4 – Delta-like ligand 4

DMS - Demarcation membrane system; demarkacinė membraninė sistema

EHM – Extramedullary haematopoiesis; ekstramedulinė hematopoezė

ERK – Extracellular signal-regulated kinase

Fc – Fragment crystallisable region of the antibody

FGF1 – Fibroblast growth factor 1

FGF2 – Fibroblast growth factor 2

FLI1 – Friend leukaemia integration 1 transcription factor

Flt-3 – FMS-like tyrosine kinase 3

FOG-1 – Friend of GATA protein 1; dar vadinamas Zinc finger protein ZFPM1

GATA1 – GATA-binding factor 1

GPVI – Platelet glycoprotein VI

HLA-DR – Human leukocyte antigen DR isotype

HSC – hematopoietic stem cell; hematopoetinė kamieninė ląstelė

IFN – Interferon

IGF – Insulin-like growth factor

IL-1 β – Interleukin 1 beta

IL-6 – Interleukin 6

IL-8 – Interleukin 8

JAK – Janus kinase

KIFC1 – Kinase family member C1

lncRNR – Long non-coding ribonucleic acid

LOX – Lysyl oxidase

MHC – Major histocompatibility complex

miRNR – Micro ribonucleic acid

MPL – Myeloproliferative leukaemia gene

MPP2 – Multipotent progenitor cell 2

MPP3/4 – Multipotent progenitor cell 3/4

mTOR – Mammalian target of rapamycin

NF-E2 – Nuclear factor erythroid 2

Notch-1 – Neurogenic locus notch homolog protein

P2Y12 – Purinergic receptor P2Y

Pa – Pascal

PAR4 – Protease-activated receptor 4

PDGF – Platelet-derived growth factor

RNR – Ribonucleic acid

RT – reticulated platelet; retikuliuotas trombocitas

RUNX1 – Runt-related transcription factor 1

SCF – Stem cell factor

ST-HSC – Short term hematopoietic stem cell

STAT – Signal transducer and activator of transcription

TCF21 – Transcription factor 21

TGFβ1 – Transforming growth factor beta 1

TLR - Toll-like receptor

TNF – Tumour necrosis factor

TPO – Thrombopoietin

VCAM-1 – Vascular cell adhesion protein 1

VEGF – Vascular endothelial growth factor

vWF – Von Willebrand factor; Von Vilebrando faktorius

2. IVADAS IR TIKSLAI

Trombocitų gamyba – tai sudėtingas procesas, kuris apima megakariocitų brandą, diferenciaciją ir fragmentaciją į dukterinius trombocitus. Šis procesas yra būtinas normaliam kraujo krešėjimo mechanizmų veikimui ir apsaugai nuo kraujavimo. Trombopoezės sutrikimai, tokie kaip trombocitopenija (pavyzdžiui imuninė trombocitopenija) ar trombocitozė, turi tiesioginę klinikinę reikšmę ir gali lemti sunkius padarinius tiek vaikų, tiek suaugusiųjų sveikatai. Pastaraisiais metais sparčiai vystosi nauji gydymo metodai paremti molekulinio trombopoezės mechanizmo supratimu (pavyzdžiui trombopoetino receptų agonistai). Gilesnis bei tikslesnis šio proceso mechanizmų ir lokalizacijos suvokimas tampa vis svarbesnis klinikinėje praktikoje galvojant apie ateities perspektyvas trombopoezės ir megakariopoezės sutrikimų gydyme.

Nors tradiciškai buvo manoma, kad trombocitų gamyba vyksta tik kaulų čiulpuose, naujausi tyrimai rodo, kad megakariocitai gali veikti ir ekstrameduliniuose organuose, ypač plaučiuose. Šie duomenys verčia iš naujo peržiūrėti nusistovėjusios trombopoezės modelius bei bandyti pateikti atsakymus į ilgą laiką šią sritį supančius klausimus. Nepaisant pastangų, mokslinėje literatūroje tebėra išsiskiriančių nuomonių dėl trombopoezės mechanizmo bei vietos, megakariocitų nišų lokacijų bei šių ląstelių migravimo tarp organų galimybių. Šie neapibrėžtumai apsunkina tiek tyrimų kryptingumą, tiek jų pritaikomumą klinikinėje praktikoje.

Šio darbo tikslas – išanalizuoti literatūrą apie trombopoezės mechanizmus ir lokaciją fiziologinės normos bei patologinio streso sąlygomis, išskiriant susijusių ląstelių (hematopoetinių kamieninių ląstelių, megakariocitų, trombocitų) fiziologijos aspektus, kurie galėtų būti svarbūs tolimesnėms diskusijoms. Be to, bus aptariami pagrindiniai teoriniai modeliai, naujausi eksperimentiniai duomenys ir jų potenciali svarba, siekiant gilinti supratimą apie trombopoezės eigą ir šio proceso sutrikimų reikšmę žmogaus sveikatai.

3. DARBO METODIKA

Ši literatūros apžvalga buvo atlikta sistemingai, siekiant identifikuoti, atrinkti ir įvertinti aktualius mokslinius šaltinius nagrinėjančius trombopoezės mechanizmus ir lokalizaciją tiek normaliomis, tiek pataloginėmis sąlygomis. Metodologinis tikslas – užtikrinti šaltinių aktualumą, mokslinį pagrįstumą ir teminį atitikimą pagrindiniams darbo klausimams.

Literatūros šaltiniai buvo ieškomi naudojantis PubMed duomenų baze. Naudoti raktiniai žodžiai ir jų deriniai: „thrombopoiesis“, „megakaryocytes“, „proplatelets“, „bone marrow niche“, „lung

thrombopoiesis“, „platelet biogenesis“, „stress thrombopoiesis“, „extramedullary thrombopoiesis“, „platelet“. Taip pat naudojami atitinkami MeSH terminai. Pagrindinė paieška buvo apribota straipsniais, publikuotiems nuo 2014 metų iki 2024 metų, tik anglų kalba. Papildomai atlikta rankinė atrinktų publikacijų literatūros sąrašų peržiūra, siekiant identifikuoti papildomus aktualius šaltinius, kurie neatitinko pirminių paieškos kriterijų.

I literatūros apžvalgą buvo įtraukti recenzuoti moksliniai straipsniai, apžvalgos, bei eksperimentiniai tyrimai su žmonėmis ir gyvūnais, kurie yra aktualūs darbo temai. Neįtraukti straipsniai, kuriuose trūksta metodologinio aiškumo, nepublikuoti darbai, bei publikacijos, kurių pilnas tekstas nebuvo prieinamas.

Surinkti duomenys buvo analizuojami kokybiniu būdu, išskiriant svarbiausias temas, teorinius modelius ir mokslines nuomones. Pateikiama apžvalga remiasi įvairių autorių pozicijų sugretinimo ir kritiniu duomenų vertinimu.

4. MEGAKARIOCITAI

Megakariocitai – tai didžiausios žinduoliuose randamos kraujodaros ląstelės, bet sudaro tik 0,05% visų kaulų čiulpų ląstelių.[1] Žmogaus fiziologijoje megakariocitai yra vieninteliai trombocitų šaltiniai, todėl jų vaidmuo palaikant kraujodaros homeostazę yra itin svarbūs. Šios ląstelės kasdien į kraujotaką išskiria dešimtis tūkstančių trombocitų. Be to, megakariocitai yra didžiausios branduolį turinčios ląstelės žinduoliuose, o jų skersmuo gali svyruoti nuo 20 iki 100 mikrometrų, priklausomai nuo ląstelės brandumo stadijos.

Šiame skyriuje daugiausia dėmesio bus skiriama nesubrendusių megakariocitų genezei, morfologijai, fiziologijai, bei pagrindiniams pokyčiams vykstantiems prieš trombopoiezę. Megakariocitų fiziologija ir vystymasis yra svarbūs svarstant teorijas, susijusias su trombocitų gamybos metodu ir vieta, nes megakariocitai yra vieninteliai žinomi trombocitų šaltiniai.

4.1 NUO KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ IKI MEGAKARIOCITŲ

Kaip ir kitos kraujodaros ląstelės, megakariocitai kyla iš pliuripotentinių kraujodaros kamieninių ląstelių (*ang. hematopoietic stem cells, toliau HSC*). Tradiciškai manyta, kad megakariocitai diferencijuojasi iš HSC hierarchiniu principu, tai yra pereinant daugiapotentinio progenitoriaus, paprastojo mieloidinio progenitoriaus, megakariocitinio-eritroidinio progenitoriaus ir megakariocito

progenitoriaus stadijas.[1] Tačiau yra įtakingų įrodymų, jog HSC gali diferencijuotis tiesiogiai į bet kurią megakariocito diferenciacijos stadiją esant atitinkamiems stimulams, pavyzdžiui ablacijos ar transplantacijos atvejais.[2][3][4] Hierarchinis megakariocitų diferenciacijos modelis buvo sukurtas remiantis Notta ir kolegų, Carrelha ir kolegų, bei Rodriguez-Fraticelli ir kolegų duomenimis, kadangi buvo stebimi linijai specifiški multipotentiniai progenitoriai, kurie dalijosi ne iš pluripotentinių HSC, o iš žemesnės megakariocitams specifinės HSC. Kaulų čiulpuose aptiktos vWF+ (*Von Willebrand factor*) HSC ląstelės, stebimos arti perivaskulinėse nišose esančių megakariocitų, laikomos svariu įrodymu, jog kaulų čiulpuose egzistuoja nehierarchinis HSC pogrupis, skirtas megakariocitų diferenciacijai.[5] Manoma, jog šis pogrupis vWF+ HSC turi genetiškai nustatytą likimą diferencijuotis į megakariocitus, kurie taip pat gamina ir pateikia vWF. Toks nehierarchinis diferenciacijos kelias padeda užtikrinti greitą ir tikslingą megakariocitų populiacijos atkūrimą, ypatingai esant dideliui poreikiui.

Ankstyviausias HSC žymuo yra CD34, kuris nuosekliai išreiškiamas visose vėlesnėse kraujodaros ląstelėse, įskaitant megakariocitus. [6] Jeigu ląstelė savo paviršiuje pateikia CD41 ir CD34, citomorfologiškai ji laikoma megakariocitu. HSC įsipareigojimą į megakariocitinę eilę skatina transkripcijos faktoriai tokie kaip RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*), FLI1 (*Friend of leukaemia integration 1 transcription factor*), GATA1 (*GATA-binding factor 1*). [7] Trombopoetinas (TPO) taip pat atlieka svarbų vaidmenį HSC įsipareigojimui megakariocitų linijai. TPO arba jo receptoriaus trūkumas sukelia ryškią trombocitopeniją, kuri siejama su megakariocitų brendimo nutraukimu.[8] Tyrimai rodo, kad senėjančios HSC kaulų čiulpuose linkusios diferencijuotis į mieloidines ląsteles daugiau nei į limfoidines ląsteles, nors šio poslinkio priežastys dar nėra galutinai nustatytos.[9] Grover ir kolegų atliktas tyrimas parodė, kad su amžiumi HSC įgyja trombocitų diferencijavimo šališkumą, galimai dėl FOG-1 (*Friend of GATA protein 1*) transkripcijos reguliavimo.[9] Be to, buvo pranešta apie reikšmingą anksčiau neaprašytos HSC klasės, gaminančios tik trombocitus, pagausėjimą. Vėlesnis Carrelha ir kolegų tyrimas patvirtino trombocitams šališko HSC egzistavimą; tiek "trombocitams šališki" HSC, tiek klasikiniai trombocitų progenitoriai buvo apibūdinti kaip gyvenantys toje pačioje kaulų čiulpų nišoje, todėl juos sunku atskirti.[3] Įdomu tai, kad trombocitams šališkos HSC vis tiek galėjo diferencijuotis į kitas kraujodaros ląsteles, kai buvo naudojami specifiniai *in vitro* stimulatoriai. Iš dalies šis pastebėjimas patvirtina prieš tai minėtą laipsnišką įsipareigojimą, kurio fiziologinė prasmė tikriausiai susijusi su kraujodaros sistemos labilumu reaguojant į stresines situacijas, pavyzdžiui ūminį kraujavimą. Šios išvados yra svarbios, nes jos išplečia HSC įvairovės spektrą, galbūt net padidindamos tikimybę, kad linijai būdingos HSC populiacijos egzistuoja už kaulų čiulpų ribų.

Laipsniškas, sklandus perėjimas nuo pliuripotentinių HSC iki galutinės megakariocitų linijos didina tarpląstelių signalų perdavimo sudėtingumo lygį, apie kurį mes iki šiol žinome mažai. Tyrimai, susiję su kaulų čiulpų abliacija, bei su selektyvia kraujodaros ląstelių abliacija, parodė, kad bendra megakariocitų abliacija iš kaulų čiulpų padidina HSC proliferaciją. [10][11] Tikslus mechanizmas, kuriuo selektyvi megakariocitų populiacijų abliacija sukelia HSC reguliavimą, yra neaiškus, tačiau kai kurias išvadas galima padaryti remiantis tuo, kas žinoma apie megakariocitų signalų perdavimo kelius. Pavyzdžiui, buvo nustatyta, kad TGFβ1 (*Transforming growth factor beta 1*) ir CXCL4 (*Chemokine ligand 4*) yra citokinai, kuriuos išskiria megakariocitai, kad slopintų HSC *in vivo*. [10] Kita vertus, nustatyta, kad FGF1 veikia kaip HSC stimulatorius po mieloabliacijos pelėse. [12] Taigi iš dabartinių tyrimų aišku, kad HSC reguliavimas yra daugialypis procesas. Žinoma, kad homeostatinis stresas turi reikšmės HSC proliferacijos moduliacijai, ypač po ekstremalių sąlygų, tokių kaip kaulų čiulpų abliacija. Tačiau HSC homeostazę gali įtakoti daugybė veiksnių, tiek lokalūs, tiek sisteminiai. Todėl tiriant HSC specifinį signalizavimą svarbu atsižvelgti į tai, ar eksperimentinė metodika imituoja žmogaus fiziologiją ramybės būsenoje, ar patiriant hematologinį stresą, kad būtų galima padaryti moksliskai pagrįstas išvadas.

4.2 MEGAKARIOCITŲ FIZIOLOGIJOS APŽVALGA

Nebrandus megakariocitas praeina kelis esminius fiziologinius pokyčius kol galiausiai tampa subrendusia, trombopoezei pasiruošusia ląstele. Šis procesas vadinamas megakariopoeze ir detaliam bus aptariamas vėliau. Pirmiausiai bus apžvelgiama nebrandaus megakariocito morfologija bei fiziologija, kadangi aiškus šių gyvybiškai svarbių ląstelių apibūdinimas svarbus tolimesnėms diskusijoms.

Megakariocitai nuo kitų kraujodaros ląstelių išsiskiria savo dydžiu, kuris įvairių autorių duomenimis svyruoja nuo 20 iki 100 mikrometrų. [13] Dar vienas išskirtinis megakariocitų morfologinis bruožas yra jų branduolys. Nesubrendusių megakariocitų branduolys yra apvalus arba ovalus, ir sudaro reikšmingą ląstelės tūrio dalį. Skirtingai nuo subrendusių megakariocitų, kurių branduoliai būna mažesni, bet pasižymi poliploidiškumu, nesubrendę megakariocitai šio bruožo neturi. Šių ląstelių citoplazma nėra pilnai išvystyta, lyginat su subrendusiais megakariocitais. Šviesos mikroskopijos metu citoplazma turi melsvą atspalvį dėl gausaus kiekio ribosomų, kurios dalyvauja baltymų sintezėje. Ankstyvas brendimo požymis yra citoplazmos kiekio ląstelėje didėjimas. [14] Taipogi galima stebėti citoplazmines granules, bet šios struktūros taip pat būdingesnės megakariopoezė praėjusioms ląstelėms. Plazminė membrana nebrandiems megakariocitams leidžia sąveikauti su mikroaplinka, kuri būtina jų išgyvenamumui bei tolimesniam

brendimui. Specifinių tyrimų nagrinėjančių, kokie signalai skatina brendimo megakariocitų procesą nėra daug, tačiau manoma, kad šiame procese svarbų vaidmenį atlieka plazminės membranos invaginacija.[14] Nebrandiems megakariocitams būdingos invaginacijos ir pseudopodijos, kurios morfologiškai skiriasi nuo brandžių ląstelių formuojamų protrombocitų, nes pastarieji neskyla į trombocitus ir nesąveikauja su perivaskuliniu sinusoidu. [15] Galiausiai, nebrandžių megakariocitų citoskeletas yra mažiau organizuotas nei brandžių megakariocitų, o tai leidžia jiems didėti brendimo metu. [15]

Transkriptomines analizės tyrimai parodė, kad tiek žmogaus, tiek pelių kaulų čiulpuose megakariocitai sudaro funkcinį požiūriu heterogeninę ląstelių populiaciją. Sun ir kolegos išskiria tris funkcinis pogrupius: trombocitus gaminančius megakariocitus, HSC nišą palaikančius megakariocitus ir imuninius megakariocitus. [16] Imuninio tipo megakariocitai savo membranos paviršiuje išreiškia imuninės sistemos žymenis, tokius kaip TLR (*Toll-like receptor*), Fc receptorius (*Fragment crystallisable region of the antibody*), MHC (*Major histocompatibility complex*) II klasės receptorius, CD11c bei kitus. Ypač reikšminga, plaučiuose randami megakariocitai pasižymi dar aukštesniu TLR išraiškos lygiu, aktyviai dalyvauja patogenų atpažinime, sekretuoja uždegiminius citokinus ir skatina uždegiminį atsaką. Liu ir kolegos išplečia šią trijų pogrupių sistemą ir argumentuoja, jog megakariocitai gali būti išskiriami į penkis pogrupius. [17] Naudojantis *in vitro* kaulų čiulpų mėginių analize autoriai detaliau išskaido imuninių megakariocitų pogrupį, o tai parodo platų megakariocitų imuninių galimybių spektrą. Pavyzdžiui, Liu ir kolegos identifikuoja CD40L+ megakariocitus kaip gebančius skatinti B ląstelių proliferaciją, dendritinių ląstelių diferenciaciją, bei autoimuninius procesus. Apibendrinant, šie tyrimai yra reikšmingi, nes jie praplečia megakariocitų funkcijų spektrą, atskleidžia jų vaidmenį už hemostazės ribų, neapsiribojant vien tik trombocitų gamyba.

5. TROMBOPOETINAS

5.1 TROMBOPOETINO FIZIOLOGIJA

1958 metais Kelemanas pirmą kartą panaudojo terminą „trombopoetinas“, apibūdindamas humoralinį faktorių atsakingą už trombocitų gamybą. [18] Kelemano siūloma molekulė beveik keturis dešimtmečius buvo teorinė iki 1994 metų, kai trombopoetinas (TPO) buvo pirmą kartą išskirtas ir sintetintas *in vitro*. [19][20][21][22][23] Nuo to laiko tyrimai parodė, jog TPO svarbus ne tik trombocitų gamybai, bet dalyvauja beveik visose trombocitų-megakariocitų sąsajos augimo, diferenciacijos, bei funkcijos reguliavimo procesuose. Svarbu paminėti, jog TPO nėra reikalingas

protrombocitų gamybai trombopoezės metu. [24] Priešingai, *in vitro* tyrimai rodo, jog TPO galimai turi slopinantį poveikį šiam svarbiam trombopoezės etapui. [25]

TPO daugiausia sintetinamas kepenyse, tačiau taip pat yra gaminamas inkstuose ir kaulų čiulpuose. [26] TPO sintezė prasideda nuo MPL geno (*Myeloproliferative leukaemia gene*) transkripcijos, translacijos, o gautas baltymas glikozilinamas. Gautas glikoproteinas išskiriamas į kraują ir pasklinda po organizmą. TPO receptorių, C-MPL (*Myeloproliferative leukaemia protein*), randamas ant membraninio HSC paviršiaus, megakariocitų eilės progenitorių, megakariocitų, bei trombocitų. [21] C-MPL receptoriaus aktyvavimas per TPO yra pagrindinis megakariopoezės reguliatorius, veikiantis per JAK/STAT ir ERK/AKT/CREB signalų perdavimo kelius. [27] Taipogi, C-MPL aktyvavimas palaiko HSC nišas ramybės būsenoje, bei užtikrina jų genomo vientisumą bei replikaciją. [28] MPL geno mutacijos sukelia įgimtą amegakariocitinę trombocitopeniją. [29] Tai reta autosominiu recesyviniu būdu paveldima liga, kuriai būdingi stiprūs arba vidutinio sunkumo kraujavimai. Ligos pasireiškimas sunkiais atvejais būna iš karto po gimimo, o lengvesnės eigos atvejais – per pirmus pora gyvenimo metų. Yra kelios galimos MPL geno mutacijos, bet visais atvejais stebimi atipiniai megakariocitai arba jų nebuvimas kaulų čiulpuose. Būklė progresuoja iki aplazinės anemijos bei pancitopenijos. Manoma, jog mutacija trikdo arba stabdo TPO signalo perdavimo kelius per C-MPL, o tai sukelia HSC ląstelių diferenciacijos nepakankamumą, pasireiškia kraujavimo ir pancitopenijos klinika. [30]

TPO koncentracija plazmoje yra griežtai kontroliuojama. [31] Šiuo metu literatūroje identifikuoti keli TPO koncentraciją reguliuojantys veiksniai. Didelis cirkuliuojančių trombocitų skaičius neigiamu grįžtamoju ryšiu didina C-MPL ekspresiją ant megakariocitų plazminių membranų, taip pašalinamas TPO iš sisteminės kraujotakos. [26] Mažas trombocitų skaičius slopina C-MPL ekspresiją ir to pasekoje išgaunama didelė TPO koncentracija plazmoje. Šis grįžtamojo ryšio mechanizmas užtikrina, kad TPO atitinkamai reaguotų į besikeičiantį trombocitų skaičių. Išoriniai veiksniai, tokie kaip uždegiminiai procesai bei kepenų funkcijos nepakankamumas, taip pat turi įtakos TPO koncentracijai. Uždegiminiai citokinai, tokie kaip IL-6 (*Interleukin 6*) ir TNF (*Tumour necrosis factor*) gali stimuliuoti TPO gamybą. [32] Kepenų ligos, tokios kaip cirozė ir fibrozė, mažina kepenų sintetinio galimybes, taip neigiamai paveikdamos TPO koncentraciją. [33] TPO gamybos reguliacija kepenyse iki šiol nėra detaliai ištirta, tačiau pranešama apie signalo perdavimą per Notch-1 (*Neurogenic locus notch homolog protein*) ir DLL-4 (*Delta-like ligand 4*) receptorių hepatocituose ir šių signalo perdavimo kelių sąsają su didesne TPO koncentracija. [34] Šio tyrimo autoriai teigia, kad šis signalizavimas vyksta dalyvaujant trombocitams, todėl galima manyti, kad trombocitų kiekis kraujyje gali turėti tiesioginę įtaką sisteminiams TPO koncentracijai.

5.2 TROMBOPOETINO KLINIKINĖ REIKŠMĖ

Trombopoetino receptorių agonistai - tai vaistų grupė, imituojanti endogeninio TPO poveikį megakariocitams ir skatinti trombocitų gamybą. Šiuo metu klinikinėje praktikoje patvirtinti trys šios grupės atstovai: eltrombopagas, avatrombopagas, ir romiplostinas. Specifinis trombocitų gamybos skatinimas indikuotinas imuninės trombocitopenijos, refrakterios aplazinės anemijos, bei kelių kitų būklių atvejais. Svarbu, jog TPO mimetikai kontraindikuotini mielodisplastinio sindromo atvejais, kadangi jų vartojimas gali sukelti būklės paūmėjimą. Trombopoetino receptorių agonistų veikimas priklauso nuo C-MPL aktyvinimo, kuris sukelia megakariocitų diferenciaciją ir proliferaciją bei trombopoezę.

Kaip trombopoetino receptorių agonistai sukelia trombocitų skaičiaus didėjimą nėra pilnai aišku. Romiplostinas, sintetinis TPO mimetinis peptidas, sujungtas su žmogaus IgG1 Fc fragmentu, kuris jungiasi prie MPL receptoriaus išorinio domeno, konkuruodamas su endogeniniu TPO. [35] Klinikinių tyrimų duomenimis, romiplostinas ne tik veiksmingai skatina megakariocitinės linijos diferenciaciją, bet ir didina eritroidinės bei granulocitinės linijos ląstelių kiekį. [36] Tai leidžia manyti, kad pagrindinis romiplostino veikimo mechanizmas yra susijęs su HSC stimuliavimu ir regeneracija. Vienaląstės RNR sekoskaitos analizės metu nustatyta, kad romiplostinas pasižymi poveikiu CD34+CD38- HSC pogrupiams, o tai laikoma primityvia HSC linija. [37] Kiti trombopoetino receptorių agonistai tokia savybe nepasižymi. Eltrombopagas ir avatrombopagas yra mažos molekulės, kurios, skirtingai nuo romiplostino, jungiasi prie transmembraninio MPL receptoriaus domeno. Šie preparatai nekonkuruoja su endogeniniu TPO, dėl to manoma, jog jų poveikis yra sinergistinis su TPO ir iš dalies priklausomas nuo jo. [37] Skirtingi mimetikų prisijungimo prie išorinio ir transmembraninio C-MPL domeno mechanizmai lemia nevienodą genų reiškos reguliavimą: eltrombopagas indukuoja transferino receptoriaus ekspresiją, o romiplostinas šio poveikio nesukelia. Šis skirtumas rodo, kad skirtingi TPO mimetikai gali turėti skirtingą ir specifinį poveikį, kuris dar nėra iki galo suprantas. Atsižvelgiant į augantį mokslinių tyrimų skaičių apie megakariocitų sąveiką su HSC ir jų vaidmenį perivaskulinėse nišose, galima tikėtis, kad ateityje trombopoetino receptorių agonistų veikimo mechanizmai bus išsamiau išaiškinti.

Trombopoetino receptorių agonistų vartojimas nesukelia sunkių, gyvybei pavojingų šalutinių reiškinų, jeigu preparatai vartojami imuninės trombocitopenijos ar refrakterios aplazinės anemijos gydymo tikslais. Visgi tai ir išlieka pagrindinis šios vaistų klasės trūkumas: trombopoetino receptorių agonistai yra veiksmingi tik siauram pacientų ratui, nes jiems trūksta selektyvumo megakariocitinės eilės skatinimui. Pavyzdžiui, sergant mielodisplastiniam sindromui šių preparatų skirti negalima, kadangi jie visi veikia HSC, o tai nėra pageidautina visų trombocitopenijų atvejais.

Taip pat šie preparatai nėra tinkami pacientams su įgimtais ar įgytais TPO/MPL signalinės ašies sutrikimais. Todėl, nepaisant sėkmingo taikymo tam tikrose būklėse, trombopoetino receptorių agonistai kol kas neatitinka poreikio veiksmingai ir selektyviai moduluoti trombocitų-megakariocitų ašį plačiam hematologinių trombocitopenijų spektrui gydyti. Tai reiškia, kad daugelio pacientų priežiūroje vis dar tenka remtis bent daliniu trombocitų transfuzijų poreikiu.

6. MEGAKARIOPOEZĖ

Megakariopoezė – tai megakariocitų brendimo procesas, kurio metu stebimas ląstelės tūrio ir ploidiskumo didėjimas, specifinių paviršiaus receptorių išraiška bei invaginuotos membranos sistemos formavimasis. Nors šie pokyčiai yra gerai aprašyti, tebėra neaišku, ar jie vyksta etapiškai, ar vienu metu. Šiame skyriuje bus aptarti pagrindiniai megakariocitų brendimo aspektai ir juos reguliuojantys mechanizmai.

6.1 ENDOMITOZĖ IR POLIPLOIDIJA

Endomitozė yra ląstelių dalijimosi procesas, būdingas megakariocitams. Skirtingai nuo įprastos mitozės, prasidėjus endomitozei megakariocitų branduolyje vyksta pakartotinė DNR replikacija, tačiau ląstelė nepasidalija. [1] Anksčiau buvo manoma, kad endomitozė atitinka B anafazės nesėkmę. [38] Ši teorija buvo paneigta tyrimais, kurie parodė, kad procesas sustoja vėlyvoje citokinezėje. [39] Endomitozės pabaigoje megakariocitų branduolys yra poliploidinis, svyruoja nuo 4n iki 128n dydžio. [40] Pažymėtina, kad normaliomis sąlygomis brandūs megakariocitai palaiko 16n branduolius. [1] Branduolys yra akivaizdžiai segmentuotas, tačiau nesidalija, kaip būtų galima tikėtis esant normaliam mitoziniam dalijimuisi.

Poliploidijos reguliavimo mechanizmai išlieka nevisiškai aiškūs. TPO vaidina svarbų vaidmenį beveik visuose megakariopoezės etapuose, įskaitant endomitozę. [6] TPO aktyvuoja savo receptorių C-MPL ir inicijuoja signalo perdavimo kaskadą, kuri priklauso nuo JAK2 kinazės (*Janus kinase 2*). [41] Nustatyta, kad pelės, kurioms trūksta TPO receptoriaus C-MPL turi megakariocitus, kurie yra linkę į apoptozę ir yra mažesnio ploidiskumo. [42] Kitos molekulės yra mažiau ištirtos, pavyzdžiui, kai kurie ciklinai, [43][44][45] ir Aurora B kinazė, [6] tačiau jų reikšmės *in vivo* tyrimai galėtų leisti geriau suprasti, kas skatina įvairius ploidiskumo laipsnius, pastebėtus megakariocituose *in vivo*. Visgi keli tyrimai rodo, jog poliploidiskumas nėra būtinas megakariocitams pradėti trombopoezę. [46][47] Net 2n ir 4n branduolį turintys megakariocitai gali gaminti trombocitus. [1] Šių tyrimų

įrodymų vertė šiuo metu nėra didelė, kadangi jie buvo atlikti *in vitro* ir naudojant virkštelės kraują. Daryti patikimesnes išvadas apie pilną ploidiskumo reikšmę kaip atsaką į didelį hemodinamikos pažeidimą ar netgi palaikant fiziologinę homeostazę reikia daugiau patikimų tyrimų. Rašymo metu poliploidiskumo kontrolės pobūdis megakariocituose yra labiau spekuliatyvus nei faktinis, nes iki šiol nėra aprašyti aiškūs molekuliniai keliai per kuriuos būtų galima paaiškinti megakariocitų ploidijos pokyčius.

Taip pat neaiškus poliploidinio branduolio biologinis būtinumas. Poliploidizacija teoriškai gali suteikti megakariocitams didelę sintetinę produkciją, kad per trumpą laiką būtų galima pagaminti daug trombocitų. [40] Kadangi megakariocituose jau yra dukterinių ląstelių baltymų komponentų, endomitozė būtų greičiausias būdas pagaminti pakankamai citoplazmos, kad būtų skatinamas didelis ląstelių skaičius. Tai atitinka akivaizdų trombocitų fiziologinį vaidmenį, nes staigų trombocitų tūrio sumažėjimą reikėtų ištaisyti taip pat greitai padidinant ląstelių skaičių. Siekiant atsižvelgti į svyruojantį trombocitų poreikį, buvo teorizuotas greito ir lėto atsako mechanizmas. [48] Megakariocitų-trombocitų ašies gebėjimas prisitaikyti prie streso yra labai svarbus, nes jokia kita hematologinė sistema neturi reikiamų pajėgumų, kad galėtų susidoroti su hemostatinės pusiausvyros disbalansu.

6.2 MEGAKARIOCITŲ CITOPLAZMINIAI POKYČIAI IR DEMARKACINĖ MEMBRANINĖ SISTEMA

Po endomitozės megakariocitai pereina į intensyvią augimo fazę, kurios metu citoplazma sparčiai užpildoma trombocitams būdingais baltymais, organelėmis ir membraninėmis struktūromis. [49] Be to, augimo fazėje megakariocitai įgyja savo specifinę ultrastruktūrą: demarkacinę membraninę sistemą bei granules. Dalis per augimo fazę pagamintų citoplazminių struktūrų bus perduodamos dukteriniams trombocitams.

Demarkacinė membraninė sistema (*ang. demarcation membrane system, toliau - DMS*) yra lygiųjų membraninių kanalų sistema, kuri susidaro megakariopoezės metu. [50] Citoplazma patiria keletą greitų invaginacijų, dėl kurių atsiranda segmentuota citoplazma. Kai DMS buvo pirmą kartą aprašyta tyrėjai priėmė išvadą, jog membranos apibrėžia būsimus trombocitus. Visgi Radley ir Haller argumentuoja, jog "demarkacinė membrana" klaidingas šios membraninės sistemos pavadinimas. [51] Iš tiesų, iki šiol nėra tyrimų leidžiančių manyti, kad DMS yra tiesiogiai susijusi su trombocitų dydžiu ar funkcinė konfigūracija. Taigi "invaginacijos membraninė sistema" gali būti tinkamesnis pavadinimas šiam tinklui apibūdinti. [51] Dabar manoma, kad labiau tikėtinas DMS

vaidmuo yra susijęs su didėjančiu citoplazmos tūriu, kuris taip pat susijęs su poliploidiniu ląstelės pobūdžiu. Teorija, kad DMS yra trombocitų šablonas kurį laiką buvo pateikta kaip patikima, [52] tačiau skilimas sulyg DMS iki šiol nėra užfiksuotas tiesiogiai. Visgi DMS susidarymas iš dalies gali turėti įtakos dukterinių trombocitų funkcijai bei struktūrai. Tyrimai rodo, kad DMS sudaro „trombocitų teritorijas“, kuriose kaupiami trombocitų komponentai, tokie kaip trombocitams specifiniai baltymai (vWF, integrinai, p-selektinas ir kiti). [6] Tikslių vaizdavimo tyrimų šiuo klausimu rašymo metu nėra, bet gilesnis supratimas apie DMS svarbą trombocitų gamybos procese galėtų leisti tyrėjams geriau suprasti trombocitų funkcinius gebėjimus bei pritaikyti šias žinias klinikinėje praktikoje.

6.3 MEGAKARIOPOEZĖS REGULIAVIMAS

Megakariopoezė turi būti griežtai kontroliuojamas procesas, užtikrinantis pusiausvyrą tarp trombocitų gamybos ir fiziologinių poreikių tiek ramybės būsenoje, tiek streso sąlygomis. Proceso disreguliacijos pasekmės gali lemti neadekvačią trombocitų gamybą bei kaulų čiulpų mikroaplinkos sutrikdymą.

Sąveika tarp TPO ir C-MPL atlieka svarbų vaidmenį megakariopoezės reguliavime. Kaip ir minėta anksčiau, TPO/MPL signalo perdavimo kelias dalyvauja ir HSC proliferacijoje, genomo stabilumo palaikyme, bei ramybės būsenos palaikyme. [27] Esama TPO/MPL svarba megakariopoezėje iliustruoja abiejų šių aspektų glaudumą, bei megakariocitų-trombocitų ašies bendrus signalų perdavimo kelius. [53] Panašų vaidmenį atlieka kitos medžiagos: literatūroje aprašomos IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), GATA1. [54][55] 2024 metais Gaertneris ir kolegės pateikė įrodymų, jog imuninė sistema atlieka svarbų vaidmenį megakariopoezės reguliavime. [56] Atliekant tiesioginius intravitalinius stebėjimus žiurkių kaulų čiulpuose buvo stebima, kad plazmocitinės dendritinės ląstelės veikia kaip homeostazės jutikliai. Tyrėjų išvadomis, megakariocitų apoptozė inicijuoja IFN α (*Interferon alfa*) sekreciją iš dendritinių ląstelių, o šis citokinas skatina megakariopoezę kraujagyslinėje kaulų čiulpų nišoje. Šis tyrimas pateikia ne tik aiškų megakariopoezės reguliavimo mechanizmą streso bei ramybės sąlygomis, bet ir pateikia aiškų ryšį tarp imuninės sistemos bei megakariocitų-trombocitų ašies. Infekcijos dažnai sukelia trombocitų skaičiaus kraujyje pakitimus, bet priežastys iki Gaertnerio ir kolegų tyrimo nebuvo pilnai pagrįstos. Kadangi plazmocitinės dendritinės ląstelės yra įgimtos imuninės sistemos dalis, tyrėjų duomenys aiškiai parodo, jog ryšys tarp trombocitų skaičiaus ir imuninės sistemos bent iš dalies palaikomas per megakariopoezės proceso moduliavimą.

7. TROMBOCITAI

Praėjusiame skyriuje buvo detaliai aptartas megakariocitas – tai motininė trombocitų ląstelė. Procesas, kurio metu iš megakariocito išgaunami trombocitai vadinamas trombopoeze. Šis procesas bus aptariamas sekančioje dalyje. Anksčiau manyta, kad trombocitai yra tik megakariocitų fragmentai, kurie dėl savo gausumo kraujotakoje atlieka tik bazinės krešėjimo funkcijas, bet reikšmingo fiziologinio aktyvumo neturi. Plačių mokslinių tyrimų dėka dabar jau yra žinoma, kad trombocitai nėra tik atplaišos. Nors šios ląstelės neturi branduolio, jos pasižymi unikalia ląsteline struktūra bei biocheminiu aktyvumu ir vis dažniau laikomos sudėtingomis ir reikšmingomis ląstelėmis. Klasikiniu požiūriu, trombocitų pagrindinės funkcijos yra homeostazės palaikymas bei krešėjimas. Šių vaidmenų nuneigti negalima, tačiau pastaraisiais metais išryškėjo ir kitos, bene tokios pat svarbios trombocitų veikimo sritys. Tyrimai parodė, jog trombocitai turi svarbų vaidmenį imuninės sistemos veiksmingume, bei gali atskleisti svarbių niuansų iki šiol prastai valdomose būklėse. [57] Kur ir kaip vyksta trombocitų gamyba fiziologinėmis bei patologinėmis sąlygomis yra viena reikšmingiausių šių dienų mokslinių diskusijų. Atsakymai į šiuos klausimus neabejotinai padėtų nukreipti tolimesnius tyrimus būklių, kuriose dalyvauja trombocitai, patogenezėje bei gydyme.

7.1 TROMBOCITŲ FIZIOLOGIJA IR MORFOLOGIJA

Trombocitai yra branduolio neturinčios, disko formos, daugiafunkcinės kraujo ląstelės, kurių skersmuo siekia 1–3 mikrometrų. Trombocitai nesidalija mitozės būdu ir jų skaičius yra visiškai priklausomas nuo megakariocitų. Vienas megakariocitas gali pagaminti 2000 – 3000 trombocitų, [58] kad būtų palaikoma fiziologinė norma. Vidutinė trombocitų gyvavimo trukmė yra 8–10 dienų. [59] Sveiko žmogaus organizme maždaug trečdalis trombocitų kaupiami blužnyje, o likę du trečdaliai pasiskirsto kraujotakoje. [60]

Esminis trombocitų bruožas mikroskopijos metu yra gijinė žiedo struktūra, būdinga neaktyvuotam subrendusiam trombocitui. Trombocitų aktyvinimas sukelia citoskeleto pertvarkymą, kuris paverčia pailgą sferoidą į žvaigždinės formos ląstelę su ilgomis pseudopodijomis. [61] Be to, prie paviršiaus prijungta kanalų sistema yra mikrovamzdelių sistema, skirta transportuoti molekulėms tarp ląstelės išorės ir vidaus, ir mikroskopijos metu yra panaši į megakariocitų demarkacinę membraną. Panaši yra tankioji vamzdinė sistema (*ang. dense tubular system*). [61] Tačiau, skirtingai nei

mikrovamzdelių sistema, tankioji vamzdinė sistema yra uždara ir jos esminė funkcija yra susijusi su kalcio išsiskyrimu, prostaglandino, bei tromboksano sinteze. [62]

Vienas iš esminių trombocitų adaptacinių bruožų yra granulių gamyba, kuri leidžia ląstelėms greitai reaguoti į specifinius tarpląstelinius signalus, pavyzdžiui, siekiant reguliuoti kraujo hemostazę krešulių susidarymo metu. Gausiausios ir reikšmingiausios yra alfa granulės, kuriose laikomi baltymai, kurie tarpininkauja trombocitų sukibimui (von Willebrand'o faktorius), hemostazei (V faktorius, XIII faktorius), uždegimui (IL-1 β , IL-8, CXCL4) ir žaizdų gijimui (VEGF, FGF2, PDGF). [63] Mažesniais kiekiais trombocite taip pat stebimos delta granulės. Delta granulėse laikomas serotoninas, kalcio jonai, bei ATP (*Adenosine triphosphate*). [62]

Manoma, kad siekiant atlikti *de novo* baltymų sintezę, žmogaus trombocituose yra nuo 1500 iki 9500 transkriptų. [64][65] Stebimų transkriptų kitimas gali būti susijęs su trombocitų amžiumi, dydžiu ar matavimo metodu, nors buvo įrodyta, kad mažesniuose trombocituose yra įvairesnis transkriptų rinkinys nei didesniuose trombocituose *in vivo*. [66] Trombocituose buvo nustatytos kelios mažų RNR formos, ir manoma, kad miRNR (*Micro ribonucleic acid*) sudaro 80% bendros trombocito genetinės informacijos. [67] Tyrimai taip pat rodo, kad trombocitai perima RNR iš kitų kraujagyslių ląstelių per dvikryptį RNR perdavimą. [68] Gautas RNR profilio nevienalytiškumas rodo unikalius trombocitų funkcinis vaidmenis, priklausančius nuo jų dydžio ir sudėtingumo. [69] Trombocitų genomo funkcija ir reikšmė nėra iki galo nustatyta, o duomenys šiuo klausimu yra prieštaringi. [70][71][66]

7.2 RETIKULIUOTI TROMBOCITAI

Retikuluoti trombocitai (*ang. reticulated platelets, toliau RT*) – tai naujai iš kaulų čiulpų išsiskyrę trombocitai, pirmą kartą aprašyti 1969 metais Ingramo ir Coopersmitho atliekant tyrimus su šunimis, patyrusiais ūmų kraujo netekimą. [72] Šie trombocitai buvo didesni nei subrendę ir turėjo didelį likutinį RNR kiekį, kuris, dažant metileno mėlynuoju, sudarė retikuluotą raštą. RT išlaiko Golgi aparatą ir šiurkštųjį endoplazminį tinklą, todėl jie gali sintezuoti baltymus. [73][74] Jie pasižymi padidėjusiu membraninių glikoproteinų, adhezijos baltymų bei granulių kiekiu, o jų metabolinė veikla aktyvesnė nei subrendusių trombocitų. RT turi unikalią transkriptominę sudėtį, kuri nulemia jų hiperaktyvumą ir svarbą trombozės procesuose. Lyginant su subrendusiais trombocitais, RT turi reikšmingai padidėjusią GPVI (*Platelet glycoprotein VI*), PAR4 (*Protease-activated receptor 4*) ir tromboksano A2 receptorių raišką, o tai stiprina jų agregacinius gebėjimus. [75] Taip pat padidėja kalcio signalizavime dalyvaujančių ATP receptorių ekspresija.

RT išsaugo nekoduojančią RNR (miRNR, lncRNR, circRNR), kuri reguliuoja trombocitų funkcijas ir jų sąveiką su endotelio ląstelėmis. [74] Kai trombocitai atsiskiria nuo megakariocito citoplazmos, juose išlieka tam tikras kiekis RNR, kuri ilgą laiką buvo laikyta tik megakariocitų liekana be biologinės funkcijos. Vis dėlto naujausi tyrimai rodo, kad trombocitai išlaiko gebėjimą naudoti šią RNR baltymų sintezei, o tai reikšmingai išplečia supratimą apie jų biologinį aktyvumą ir funkcinį spektrą. [76] Dėl šių savybių RT siejami su didesne trombozės ir ūminio koronarinio sindromo rizika. RT klinikinę svarbą reikšmingai iliustruoja antitrombozinės terapijos skyrimo skirtumai ir efektyvumas: pacientams su aukštu nesubrendusių trombocitų frakcijos lygiu dažniau pasireiškia atsparumas klopidoireliui ir prasugireliui, nes šie vaistai neefektyviai slopina naujai susiformavusius trombocitus. Tikagreloras yra veiksmingesnis, nes jis konkurentiškai prisijungia prie P2Y₁₂ receptorių ir turi ilgesnį pusinės eliminacijos laiką, todėl išlaiko pastovų trombocitų slopinimą net naujai susidariusiems RT. [77][78] Kadangi klopidoirelis ir prasugirelis veikia negrįžtamai ir yra greitai pašalinami iš organizmo, tarp vaisto eliminacijos ir naujos dozės susidaro langas, per kurį nauji RT lieka neinhibuoti, didindami trombozės riziką. Tikagreloras, dėl savo nuolatinės inhibicijos, sumažina šią spragą ir efektyviau kontroliuoja RT hiperaktyvumą. Šis klinikinis pavyzdys aiškiai parodo RT svarbą klinikinėje praktikoje, bei iliustruoja trombocitų dinamiškumą.

7.3 TROMBOCITŲ FUNKCIJŲ APŽVALGA

Bene gausiausiai aprašyta ir ištirta trombocitų veikimo sritis yra krešėjimas. Žinoma, jog pažeidus kraujagyslės endotelį pažeidimo vietoje greitai prisitvirtina trombocitai, taip inicijuodami pirminę hemostazės fazę. [79] Po šio prisitvirtinimo įvyksta trombocitų adhezija, aktyvavimas, agregacija, iš trombocituose esančių granulių išskiriamos krešėjimą skatinančios medžiagos. Šių procesų kulminacija yra vadinamojo „hemostatinio kamščio“ susidarymas pažeidimo vietoje. [79] Procesų disreguliacijos atvejais stebimas neadekvatus krešėjimas arba pernelyg gausus kraujo krešėjimas, pavyzdžiui diseminuota intravaskulinė koaguliacija (DIK) ar imuninė trombocitopenija, kuriose trombocitų aktyvacija tampa patologinė ir kelia grėsmę gyvybei. DIK pasižymi per dideliu trombocitų ir krešėjimo sistemos aktyvavimu, o to pasekoje išsekvojami krešėjimui svarbūs komponentai ir pasireiškia kraujavimas. [80] Kitaip nei DIK, imuninė trombocitopenija dažniausiai susijusi su ADAMTS13 (*Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13*) fermento trūkumu, o to pasekoje kraujagyslės spontaniškai aktyvuoja trombocitus. [81] Susidaro mikrotrombai, ypač kapiliaruose bei arteriolėse, o tai lemia organų pažeidimus. Abu šie sindromai parodo, kokia svarbi yra tiksli

trombocitų aktyvacijos kontrolė. Be to, abiejuose šiose būklėse trombopoezė kaip trombocitų šaltinis gali būti ateities tyrimų objektas, norint pagerinti diagnostines bei gydymo perspektyvas.

Be esminės hemostazinės funkcijos, trombocitai taip pat pasižymi gausia imuninių receptorių bei citokinų ekspresija. Iš dalies tai rodo funkcinį tęstinumą tarp megakariocitų ir trombocitų, kadangi šios ląstelės turi kelis esminius bendrus receptorius. [82] Trombocitų imuninės funkcijos apima leukocitų bei endotelio ląstelių aktyvaciją, neutrofilų veiksmingumo amplifikaciją. [83] Taip pat yra duomenų, jog trombocitų išskiriamos mikrodalelės aktyvuoja fibroblastus artrito patogenezėje. [84] Panašią reikšmę trombocitai turi ir sisteminės raudonosios vilkligės patogenezėje. [85]

Naujausi tyrimai rodo, kad trombocitai dalyvauja imuninės sistemos atsake prieš patogenus. Jie geba atpažinti patogenus per Toll tipo receptorius, fagocituoti mikroorganizmus ir išskirti uždegiminius mediatorius. [57] Be to, vis labiau pripažįstama, jog trombocitai vaidina svarbų vaidmenį onkologinių susirgimų patogenezėje. Esant patologiniam ląstelių augimui, trombocitai dalyvauja naviko mikroaplinkos palaikyme, angiogenezėje, bei navikinių ląstelių migracijoje. [86] Visa tai rodo, kad trombocitai nėra tik pasyvūs kraujo komponentai – jie aktyviai dalyvauja uždegimo, infekcijų ir audinių augimo procesuose.

8. TROMBOPOEZĖS MECHANIZMO TEORIJOS

Trombopoezė yra trombocitų gamybos procesas, kurio metu iš subrendusio megakariocito išgaunami trombocitai. Proceso pabaigoje lieka nuogas megakariocito branduolys, kuris per porą valandų pašalinamas apoptozės būdu. [56] Tai sudėtingas ir griežtai reguliuojamas procesas, nors ilgą laiką buvo manyta priešingai. Mokslinių tyrimų dėka dabar yra žinoma vis daugiau apie tai, kaip vyksta trombopoezė, tačiau vis dar yra išsiskiriančių nuomonių šiuo svarbiu klausimu. Šiame skyriuje aptariami pagrindiniai iki šiol išskirti trombopoezės mechanizmai, jų privalumai bei trūkumai.

8.1 PAVIRŠINIO PUMPURAVIMO TEORIJA

1906 metais Hugh Wright'as pasiūlė teoriją, kad trombocitų gamyba vyksta paviršinio pumpuravimo principu. [87] Paviršinių pumpurų teorija teigia, kad trombocitai formuojasi tiesiai iš megakariocitų paviršiaus. Pasak šios teorijos, trombocitai yra megakariocitų membranos atplaišos. Ši teorija ilgą laiką buvo priimta mokslinės bendruomenės, nes joje buvo pateikiamas paprastas

trombocitų gamybos paaiškinimas, kuris atitiko tuo metu vyraujančią nuomonę apie paprastą trombocitų funkciją bei struktūrą. Tačiau su *in vitro* elektroninės mikroskopijos pagalba ši teorija tapo vis mažiau tikėtina. [49] Buvo aprašyti megakariocitų citoskeletiniai pakitimai prieš trombopoezę, bei megakariocitų glaudi sąveika su kraujagyslėmis prieš trombopoezės pradžią.[49] Taipogi, atliekant tariamųjų pumpurų/trombocitų mikroskopiją, juose nebuvo stebimos trombocitams būdingos organelės. Remiantis šiais duomenimis bei savo pačių mikroskopiniais tyrimais, Scurfield'as ir kolegos pasiūlė, kad trombopoezės proceso metu megakariocito membranoje atsiranda išskyrimai, o vėliau šie išskyrimai atskyja nuo motininės ląstelės ir suformuojamas trombocitas.

Visgi paviršinio pumpuravimo teorija nebuvo užmiršta. 2020 metais Potts ir kolegos atliko *in vivo* vaizdavimo tyrimą naudojant pelių modelius. [88] Šis tyrimas užfiksavo, jog bet kuriuo metu apie 50% stebimų megakariocitų kaulų čiulpuose gamino trombocitus paviršinio pumpuravimo būdu. Be to, autorių skaičiavimai rodo, jog paviršinis pumpuravimas galėtų adekvačiai palaikyti trombocitų skaičių ramybės metu. Tai pirmas tokio pobūdžio tyrimas, kuris ne tik pateikė įtikinamų įrodymų paremiančių argumentą už paviršinį pumpuravimą. Visumoje šis tyrimas gražino paviršinio pumpuravimo teoriją į galimą trombopoezės mechanizmų diskusiją. Faktas, jog tyrimas atliktas *in vivo* bei naudojant tiesioginio stebėjimo mikroskopiją, bet vertino visą organizmą, o ne tik modelinę sistemą, suteikia jam patikimumo. Tilburg ir kolegos pateikė tiesioginį argumentą paneigiantį Potts ir kolegų duomenis, teikdami jog Potts ir kolegos stebėjo vakuolių formavimąsi, o ne trombocitus. [89] Argumentuojant savo nuomonę, Tilburg ir kolegos pateikia *in vivo* protrombocitų formavimąsi stebinčius tyrimus, kurie naudojo 2D pelių kaukolių vaizdavimą. [90][91][92] Be to, Tilburg ir kolegos teigia, kad megakariocitų citoskeleto remodeliavimas yra vienas iš esminių argumentų prieš paviršinio pumpuravimo modelį, kadangi stebimi pagaminti „pumpurai“ neturi reikiamo citoskeletinio pagrindo, kuris, manoma, yra esminis sėkmingai trombocitų gamybai per protrombocitus. [93] Potts ir kolegos neatliko citomorfologinių tyrimų su jų stebimais tariamais trombocitais, todėl nėra aišku, ar tai ką jie stebėjo iš tiesų buvo funkcionuojantys trombocitai. Kaip ir buvo aptarta anksčiau, tiek megakariocitai tiek trombocitai pakuoja savo granules ir kitus intraląstelinius komponentus į vakuoles ir yra duomenų, kurie nurodo šį procesą kaip tarpląstelinį medžiagų dalijimosi būdą. [94] Taigi, abiejų pusių argumentai yra stiprūs ir paremti dideliu kiekiu informacijos, bet konsensusas iki šiol nepriimtas. Esminis klausimas, galintis išspręsti šią dilemą, ar Potts ir kolegų stebėti pumpuravimo produktai buvo trombocitai ar vakuolės, turėtų būti atsakytas. Tai galėtų suteikti dar daugiau informacijos ir tiksliai pateikti įrodymų patvirtinant ar paneigiant paviršinio pumpuravimo modelį kaip galimą trombopoezės mechanizmą.

8.2 DEMARKACINĖS MEMBRANOS SISTEMOS FRAGMENTACIJOS TEORIJA

Aptariant megakariopoezę buvo paminėta DMS struktūra. Tai – membraninės invaginacijos esančios subrendusiame megakariocyte. Yamada ir kolegos teigė, jog ši membraninė sistema nurodo būsimus trombocitus, vadinamas „trombocitų teritorijas“. [95] Pasak DMS fragmentacijos teorijos, trombocitai susidaro iš megakariocyte esančių membranų bei mikroskeleto persitvarkymo, o galiausiai išgaunami atskiri trombocitai su visomis reikiamomis organelėmis. [50] Visgi ši teorija lieka nepagrysta, kadangi nėra tiesioginių įrodymų, kurie patvirtintų siūlomus proceso žingsnius. Iki šiol nėra nei vienos publikacijos, kuri pateiktų patikimus įrodymus už megakariocito fragmentaciją palei DMS ribas.

8.3 PROTROMBOCITO TEORIJA

Becker ir De Bruyn protrombocito teoriją publikavo 1976 metais. [96] Pagal šią teoriją megakariocitai gamina protrombocitus, kurie susidaro dėl dinamiško megakariocito citoskeleto persitvarkymo, kurį skatina molekuliniai signalai. Pirmiausia, megakariocito membranoje pasirodo iškylimas, kuris ilgėja ir galiausiai tampa panašus į ataugą. Protrombocitas iš kaulinės sinusoido pusės nutįsta iki kraujagyslinės sinusoido pusės, kur mechaniniai veiksniai (pavyzdžiui kraujo tėkmės šlytis) suskaldo protrombocitą į trombocitą.

Šių dienų literatūroje vyrauja kiek modifikuota protrombocito sąvoka. Protrombocitų gamybos niuansai taip pat kiek geriau apibūdinti lyginant su pirmine teorija. Vykstant trombopoezei, protrombocito stadijoje, susidaro vadinamas citoplazminis tiltas. [49] Tai citoplazminė struktūra tarp motininio megakariocito ir būsimų trombocitų grandinės. Citoplazminis tiltas plonėja ir lūžta, o naujai suformuotos ląstelės patenka į kraujotaką. Šie naujai pagaminti trombocitai dažnai apibūdinami kaip tokio pat dydžio, kokio būtų galima tikėtis iš cirkuliuojančio trombocito. Prieš protrombocitų išsiskyrimą, megakariocituose stebimas periferinis DMS persikirstymas ir išsilyginimas, po to DMS išsiplėtimas. [91] Protrombocituose stebimos taisyklingos susiaurėjimo zonos, skersiniai mikrovamzdeliai, išsidėstę išilgai išilginių mikrovamzdelių ryšulių susiaurėjimo zonose. [49]

Visgi ši teorija turi trūkumų. Visų pirma, literatūroje cituojami tyrimai, kuriuose protrombocitų gamyba kaulų čiulpuose stebima *in vivo* yra plačiai paplitę, bet galimai nėra reprezentatyvūs kalbant apie visą organizmą. [90][91][92] Pavyzdžiui, Stegner ir kolegų tyrimas, kuriame pranešama apie stebėtus *in vivo* trombocitus, buvo atliktas naudojant trombocitopeniškas peles. [90] Potts ir kolegų teigimu, tokia *in vivo* trombopoezė neatspindi kas vyksta žmogaus organizme fiziologinės normos

atveju. [87] Galiausiai, Potts ir kolegų siūlomi duomenys rodo, jog bevykstantis pastovus paviršinis pumpuravimas adekvačiai palaikytų fiziologinį trombocitų poreikį, o tokių duomenų apie protrombocitų modelį nėra.[87] Šiuo metu duomenų kiekis, kuris patikimai galėtų paremti arba paneigti kaip konkrečiai vyksta trombopoezė esant fiziologiniam ir patologiniam trombocitų poreikiui, tačiau uždaryti šį klausimą yra svarbu norint tęsti mokslškai reikšmingus ir tikslius tyrimus susijusius su megakariocitų-trombocitų ašimi.

8.4 TROMBOPOEZĖS MODULIATORIAI

Nors diskusija apie tikslų trombopoezės mechanizmą tebevyksta, tyrimų apie šį procesą reguliuojančius veiksnius galima rasti. Transkripcijos faktoriaus NF-E2 (*Nuclear factor erythroid 2*) neturinčios pelės miršta nuo nukraujavimo, nors turi megakariocitus, kurie reaguoja į TPO augimo signalus, bet negamina trombocitų. [97]

Pasiūlyti kurie kiti galimi protrombocitų reguliatoriai, tokie kaip $\beta 1$ tubulinas, baltymų kinazė $C\alpha$, sfingozino-1-fosfatas ir CD42b. [98][99][100] KIFC1, baltymas susijęs su megakariocito cioskeleto reorganizacija trombopoezės metu, taip pat turi įtakos trombocitų gamybai. [101] KIFC1(*Kinase family member C1*) neturinčiose pelėse buvo stebima trombocitopenija bei nebuvo protrombocitų gamybos. Tačiau mechanizmai, susiję su stebimos trombocitų gamybos ir išsiskyrimo chronologijos reguliavimu, išlieka neaiškūs.

Yra sąsajis tarp trombopoezės ir megakariopoezės reguliavimo: daugiadieniai 4D vaizdiniai tyrimai stebint perivaskulinę kaulų čiulpų nišą po sisteminio trombocitų pašalinimo antikūniais parodė, jog pašalinus trombocitus jų kiekis greitai atstatomas trombopoezės perivaskulinėje nišoje, o tuo pat metu vyksta sparti megakariocitų pirmtakų diferenciacija. [56] Toks koordinuotas stresinis trombopoezės mechanizmas nurodo bendrą trombopoezės bei megakariopoezės mechanizmą, kurio mechanizmas neaiškus.

Šlyties įtaka trombopoezei svarbi, ypač kalbant apie mechaninį stresą, kurį megakariocitai patiria esant perivaskulinėje nišoje. Tyrimai rodo, jog mechaninis stresas turi tiesioginę įtaką trombocitų gamyboje, nes jis skatina protrombocitų susidarymą bei skilimą į trombocitus *in vitro*. [102] Taip pat yra įrodymų už turbulencijos svarbą trombocitų gamyboje, nors pastebima, jog turbulencijos varoma trombopoezė *in vitro* išgauna didesnius trombocitus nei randamus normaliomis sąlygomis *in vivo*. [103]

Junt et al pažymėjo, kad nors kaulų čiulpų megakariocitai išskiria protrombocitų fragmentus į kraujagysles, šie fragmentai buvo daug didesni nei įprasti trombocitai. [91] Tai lėmė galimybę, kad protrombocitų morfogenezę priklauso nuo streso ir vyksta periferinėje kraujotakoje. Pastarojo meto pastangos kuriant didelio masto bioreaktorių trombocitų gamybai parodė didesnę sėkmę gaminant *in vivo* panašius trombocitus, kai naudojami cilindriniai bioreaktoriai, kurie taiko didžiulį stresą sukibimo veiksnių, tokių kaip vWF, kontekste. [104] Duomenų už kraujagyslėse vykstančią trombopoezę (tiksliau, protrombocitų galutinio skilimo stadiją) pateikia ir keli kiti autoriai. [105][106] Teigiama, kad taip galima paaiškinti jau seniai pastebėtą iš plaučių ištekančio kraujo praturtinimą trombocitais. Kaulų čiulpų sinusoidai išteka į stambesnes venas, kuriomis kraujas teka į dešiniąsias širdies kameras. Iš dešiniojo skilvelio kraujas per plaučių arteriją patenka į plaučius, kuriuose randami kapiliarų tinklai sudaryti iš siaurų kraujagyslių. [107] Teigiama, jog būtent plaučiuose esantis kapiliarų tinklas yra pakankamai siauras ir sudaro tinkamas sąlygas trombopoezei vykti.

9. TROMBOPOEZĖS VIETOS

Ekstramedulinės kraujodaros (*ang. Extramedullary hematopoiesis, toliau EMH*) vietos apibrėžiamos kaip kraujo ląstelių gamybos vietos už kaulų čiulpų ribų. Yra įrodymų, kad EMH vietos fiziologiškai reikšmingos, tačiau morfologiškai skiriasi nuo kaulų čiulpų kraujodaros. Aktyvumas EMH vietose anksčiau buvo siejamas su hematologiniu stresu, pavyzdžiui infekcijos, neoplazijos, ar nėštumo atveju. Manoma, kad tokiais atvejais hematopoetinės kamieninės ląstelės migruoja, kad palaikytų kraujo ląstelių gamybą. Visgi pastaraisiais metais literatūroje pateikiami įrodymai, jog kaulų čiulpai gali nebūti pagrindinė trombocitų gamybos vieta ir hematopoetinių ląstelių gali būti už kaulų čiulpų ribų. Vaisiaus kraujodaros ypatumai taip pat glaudžiau susiję su EMH kraujodara. Embriono vystymosi metu hemopoezė pirmiausia vyksta kepenyse ir blužnyje, kol kaulų čiulpai tampa pakankamai išsivystę, kad perimtų šią funkciją.

Iki šiol gausiausiai aprašytos EMH vietos yra blužnis, kepenys ir inkstai. [108] Norint tikslingai aptarti esminį plaučių vaidmenį trombopoezės eigoje svarbu išnagrinėti informaciją apie kaulų čiulpų sinusoiduose vykstančią trombopoezę, bei apžvelgti žinomas EMH vietas.

9.1 KAULŲ ČIULPAI IR PERIVASKULINIS SINUSOIDAS

Ilgą laiką buvo manoma, kad kaulų čiulpai yra pagrindinė trombopoezės vieta. Iš pradžių buvo teigiama, kad kaulų čiulpų minkštimas atsakingas už trombocitų gamybą. Visgi tyrimai parodė, kad tik nedidelė HSC populiacija randama arti trabekulinio kaulo, o šios lokalizacijos ląstelių funkcija greičiausiai labiau susijusi su atsaku į hemostatinį stresą, o ne fiziologinės normos palaikymu. [109] Tokiais atvejais dažnai stebima trombocitopenija, o tai leidžia manyti, jog ilgųjų kaulų spindis nėra efektyvios trombopoezės vieta. Iš tiesų, įrodymai, pagrįsti genetiškai modifikuotų pelių modeliais bei genomo inžinerijos metodais parodė, kad trombopoezės vieta yra perivaskuliniuose sinusoiduose. [110][111][112][113] Tai – specializuotos kraujagyslės, esančios kaulų čiulpuose, kurias sudaro endotelio ląstelės, lygiųjų raumenų ląstelės, bei pericitai. [114][115] Kartu šios ląstelės sąveikauja ir sukuria HSC palankią aplinką, kurioje gali vykti megakariopoezė bei trombopoezė. Pericitai laikomi itin svarbiais palaikant HSC gyvybingumą, kadangi jie reguliuoja kamieninių ląstelių sąveiką su mikroaplinka per tiesioginį kontaktą bei citokinų sekreciją. Tai palaiko nišos struktūrinį vientisumą bei prisideda prie HSC ramybės būsenos bei išgyvenamumo. [116][117] Tyrimai rodo, jog *in vivo* sąlygomis perivaskulinėse nišose nesant pericitų, HSC migruoja gilyn į kaulų čiulpus ir taip neatlieka savo esminės hemopoezinės funkcijos. [118][119]

Kaulų čiulpų perivaskulinio sinusoido mikroaplinkoje išskiriamos dvi pagrindinės nišos - osteoblastinė ir kraujagyslinė. [110] Osteoblastinėje nišoje dominuoja osteoblastai, kadangi ši niša randama kaule. Čia HSC dažniausiai būna ramybės būsenoje, o esami megakariocitai vykdo megakariopoezę. Tuo tarpu kraujagyslinė niša, kuri yra glaudžiai susijusi su sinusoidiniais kapiliarais, atlieka galutinės brendimo vietos funkciją. Kraujagyslinėje nišoje stebimi jau diferenciaciją baigę megakariocitai, bei vyksta trombopoezė. [119] Kaulų čiulpų stromos ląstelės (osteoblastai, endotelio ląstelės, fibroblastai, adipocitai, bei specializuotos CXCL12 (*CXC motif chemokine ligand 12*) gausios retikulinės ląstelės ir kitos) padeda formuoti abiejų nišų mikroaplinką. Jos išskiria įvairius augimo faktorius, hormonus, bei adhezines molekules. Pavyzdžiui, yra duomenų apie TPO, VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*), bei fibronektino gamybą. [120] Šios medžiagos laikomos esminėmis HSC ir megakariocitų migracijoje, diferenciacijoje, bei brendime. [120] Nors TPO laikomas esminiu trombopoezės reguliatoriumi, stebėtina, kad kaulų čiulpų mikroaplinkoje esančios ląstelės gamina santykinai mažus TPO kiekius, ypač lyginant su kepenimis ar inkstais. [109] Kokią fiziologinę reikšmę turi lokaliai gaminamas TPO lyginant su sisteminiu TPO, bei kokie signalų perdavimo keliai nulemia TPO poveikį HSC nišose iki šiol nėra pilnai atsakyta.

Tai dar labiau sustiprina hipotezę, jog perivaskuliniai sinusoidai yra pagrindinė trombopoezės vieta. Šią idėją taip pat palaiko pastaraisiais metais plačiai išaugęs susidomėjimas 3D bioreaktorių modeliavimu, kurio metu tyrėjai bando sukurti trombopoezei idealias sąlygas *ex vivo* trombocitų

gamybai. [122] Jiang ir kolegų tyrimai su skirtingo standumo metilceliuliozėje diferencijuotais megakariocitais parodė, kad 30-60 Pa standumo terpėje ląstelės įgijo labiausiai *in vivo* megakariocitus primenančią morfologiją bei ploidiskumo lygį. [122] Be to, stebėta protrombocitų gamyba, o skystose terpėse augę megakariocitai protrombocitų negamino. [122] Visgi tie patys autoriai pranešė, jog minkštose terpėse (300 Pa) trombocitų gamyba buvo efektyvesnė lyginant su kaulų čiulpuose randama 34 Pa standumo aplinka. Be to, nustatyta, kad sumažinus kaulų čiulpų ekstraląstelinės matricos standumą (pvz. slopinant LOX (*Lysyl oxidase*) fermento aktyvumą), trombocitų kiekis *in vitro* padidėjo. [123] Kai kurie kolageno tipai taip pat turi įtakos trombopoezės aktyvumui, nors Shin ir kolegų priėmė išvadą, jog būtent terpės standumas yra svarbesnis negu kolagenas trombocitų gamybos reguliavime. [124] Nepaisant to, kad šių tyrimų rezultatai atskleidė dinamišką išorinių veiksnių sąveiką su trombopoeze, šių įžvalgų pritaikymas klinikinėje praktikoje yra ribotas. Paminėtina, jog autorių tikslas šių tyrimu metu yra imituoti trombopoezę, tačiau ne visada pavyksta išgryninti tikslų fiziologinių sąlygų atitikmenį, ypač kai dar daug kas nežinoma apie esminius reguliacinius procesus.

9.2 EKSTRAMEDULINĖS HEMOPOEZĖS AKTYVUMAS BLUŽNYJE

HSC blužnyje palaiko perivaskulinės nišos, susijusios su kraujagyslių sinusoidais, esančiais raudonajame minkštyme, kuriame gausu venulių per kurias blužnis aprūpinama deoksigenuotu krauju. [111][126] Kol kas nėra patikimų mokslinių duomenų palaikančių pastovią HSC nišą blužnyje, todėl blužnis laikoma antriniu kraujodaros organu. Nepaisant to, ši niša turi daug panašumų į kaulų čiulpuose randamą HSC nišą, kadangi buvo stebima, jog megakariocitai susitelkia šalia kraujagyslių sinusoidų prieš pat pasiekdami savo terminalinę diferenciaciją. Įdomu tai, kad, nepaisant šio panašumo, citokinai, kuriuos išskiria ląstelės susijusios su kraujagyslių sinusoidu siekiant išlaikyti HSC kolonijos vientisumą, yra skirtingi. Tyrimai parodė, jog EMH blužnyje priklauso nuo SCF (*Stem cell factor*) sintezės endotelio ląstelėse, taip pat nuo TCF21 (*Transcription factor 21*) ir CXCL12 sekrecijos perivaskulinėse stromos ląstelėse. [125] Ir atvirkščiai, buvo nustatyta, kad kaulų čiulpų stromos ląstelės yra TFC21 ir SCF neigiamos. [125][126] Šie tyrimai parodo, jog kaulų čiulpų ir blužnies megakariocitai reaguoja į skirtingus molekulinis signalo perdavimo kelius, o tai gali turėti reikšmingą įtaką tolimesniems tyrimams megakariocitų nišų srityje. Nors abiejuose nišose stebimos tokios pačios ląstelės, jų fenotipinis pasireiškimas skiriasi. Atsakymų į klausimą kokios gali būti skirtingų receptorių išraiškos priežastys tarp šių dviejų nišų rašymo metu nėra. Taipogi, vis dar diskutuotinas klausimas kaip megakariocitinėje nišoje atsiranda megakariocitai. Vyraujanti mokslinė nuomonė nurodo galimą HSC migravimą patologinių būklių,

tokių kaip sepsis, atvejais. Tačiau šio proceso mechanizmas bei tikslesni migracinių signalų perdavimo keliai kol kas nėra aiškūs.

Viena iš pagrindinių blužnies funkcijų laikomas kraujo deponavimas. Ankstesni tyrimai rodė, kad blužnyje egzistuoja reikšmingas ekstravaskulinis trombocitų rezervas. [127][128] Splenektomija patyrę asmenys turėjo žymiai mažesnę rezervą, o tai remia šią hipotezę. Rašymo metu duomenų apie tai, kokios galėtų būti to priežastys, ir ar blužnyje vykstanti trombopoezė neturi daugiau įtakos fiziologinėmis aplinkybėmis nei manyta iki šiol, nėra. Atsakymai į šiuos klausimus neabejotinai turėtų didelę įtaką tolimesniam mūsų supratimui apie trombocitų gamybą bei šio proceso dinamiškumą.

Nors negalima nuneigti, kad blužnyje vykstanti trombopoezė nėra pilnai iširta, per pastaruosius kelis metus publikuoti tyrimai po truputį leidžia mums įvertinti šios nišos svarbą patologinių būklių atveju. EMH niša blužnyje yra labai svarbi atkuriant hematologines ląsteles po kaulų čiulpų streso. [109] Pelėse atlikti tyrimai rodo, jog po visiškos kaulų čiulpų abliacijos blužnyje suaktyvinami mechanizmai, kurie atkuria cirkuliuojantį trombocitų skaičių. [129] Be to, atlikus splenektomiją, trombocitų skaičius greitai vėl nukrenta. Šie radiniai parodo, jog blužnis kaip EMH organas atlieka antrinę funkciją, kuri yra tiesiogiai susijusi su mažu cirkuliuojančiu trombocitų skaičiumi ir hematologinio streso indukuotu signalų perdavimu.

Šie tyrimai parodo, jog blužnis yra svarbus organas trombocitų gamybai, deponavimui, bei funkcionavimui. Išsamesnis blužnyje vykstančios ekstramedulinės trombopoezės reguliacijos supratimas ateityje galėtų turėti reikšmingą įtaką su trombocitų patologijomis susijusių ligų gydyme bei kaulų čiulpų patologijoms, tokios kaip mielofibrozę, gydyti.

9.3 EKSTAMEDULINĖS HEMOPOEZĖS AKTYVUMAS KEPENYSE

Įvairūs šaltiniai nurodo, kad kepenys yra esminė hemopoezės vieta vaisiaus vystymosi metu. [130] Kepenys taip pat gali atlikti svarbų vaidmenį trombocitų gamyboje suaugusiame žmoguje, ypač esant hematologiniam stresui. Kepenys yra pagrindinė TPO gamybos vieta, o naujausi duomenys rodo, kad kepenų sinusoidai gali būti megakariocitų niša. Galimas nišos buvimas kelia daug klausimų apie jos funkciją, reikšmę fiziologijos bei patologijos atvejais, bei reikšmę trombocitų gamybos procese.

Vaisiaus vystymosi metu kepenys yra pagrindinė hemopoezės vieta. Nuo maždaug 6-8-tos nėštumo savaitės šią funkciją kepenys perima iš trynio maišo. [131] Kepenyse hemopoezė vyksta maždaug

iki 20-tos nėštumo savaitės ir tada pereina į kaulų čiulpus. Hemopoezės perėjimas iš kepenų į kaulų čiulpus yra sudėtingas procesas, kurį gali lemti kaulų čiulpai. Juose formuojasi specifinė mikroaplinka, kuri skatina HSC migravimą iš kepenų į kaulų čiulpus. [131] Kita teorija teigia, jog kepenų kraujodaros funkcijos užprogramuotos sustoti. [132] Kokie veiksniai nulemia pilną kraujodaros persikėlimą iš kepenų šiuo metu galima tik spėlioti, kadangi tyrimų šioje srityje nėra daug. Pranešama, kad CXCL12 ir CXCR4 sąveika dalyvauja šio proceso reguliavime, bet vien tik šių duomenų nepakanka patikimai paaiškinti šio fiziologiškai reikšmingo proceso. [133]

Kepenų mikroaplinka palanki HSC proliferacijai ir diferenciacijai. Pirmiausia šios ląstelės atsiranda aortos-gonadų-mezonefrono regione, tada migruoja į kepenis, kur sparčiai dauginasi. [131] Kepenų hepatoblastai išskiria įvairius augimo faktorius bei citokinus, kurie skatina HSC bei palaiko tinkamą joms mikroaplinką. Pagrindinis augimo faktorius vaisiaus kepenų megakariopoezėje ir trombopoezėje yra TPO, kuris aktyvuoja mTOR signalų perdavimo kelią. [134] mTOR teigiamai veikia HSC bei trombocitų-megakariocitų ašies augimą bei diferenciaciją. Iki šiol dar nėra žinoma kaip kiti kepenų stromos komponentai dalyvauja megakariocitų nišos palaikyme bei trombocitų gamyboje. Daugiau tyrimų susijusių su vaisiaus kraujodara, ypač trombopoeze, galėtų būti naudingi ne tik mokslinio akiračio plėtime, bet ir esminių augimo signalų kelių perdavimo išaiškinime. Kol kas pagrindinis šio proceso vedlys yra TPO, bet vaisiaus kraujodara galėtų atskleisti dar iki šiol nežinomų variantų. Tyrimai rodo, kad vaisiaus kepenyse megakariocitų pirmtakai yra hiperproliferaciniai ir gamina mažo ploidiskumo (2N ir 4N) subrendusius megakariocitus. [133] Visais kitais atžvilgiais kepenų megakariocitai vaisiuje nesiskiria nuo suaugusiojo megakariocitų kaulų čiulpuose: stebimos granulės, gerai išvystyta invaginacinė membranų sistema, bei aktyviai vyksta protrombocitų gamyba. Ar mažą ploidiskumą lemia skatinamieji ar slopinamieji procesai nėra aišku.

Kepenys laikomos TPO šaltiniu, o jų vaidmuo trombopoezėje iki šiol nėra gerai aprašytas. Sąsajis su megakariocitų-trombocitų ašimi ribotas. Naujagimių staigios mirties atveju aptinkami kepenų megakariocitai, o literatūra tai sieja su hipoksine naujagymių būklę prieš mirtį. [135] Šie radiniai verčia manyti, jog veiksniai, kurie vaisiaus laikotarpiu palaikė HSC nišas, išlieka ir pas suaugusiuosius bei vaikus, bet fiziologinės homeostazės palaikyme nedalyvauja. Vertės šiai teorijai prideda klinikiniai duomenys patologijos atveju. Pavyzdžiui, naujagimių bei kūdikių kepenyse autopsijų metu megakariocitai aptinkami dažniau jeigu prieš mirtį buvo stebima pancitopenija, sepsis, ar kitos hematologinės ligos. [131] Taip pat, sergant mielofibroze, kepenų ligomis, ar esant kaulų čiulpų nepakankamumui, į kepenis gali būti pritraukiamos megakariocitų pirmtakų ląstelės. [136] Analogiški procesai jau buvo aptarti blužnyje, kuri irgi yra EMH organas. Konkrečiai kaip vyksta HSC ar megakariocitų pirmtakų migracija iš kaulų čiulpų ar kitų vietų nėra žinoma. Ši

spraga mūsų supratime apie suaugusiųjų kraujodarą užkerta kelią detaliau suprasti kraujodaros subtilumus, kas turi įtakos bandant pritaikyti gydymo galimybes trombocitopenijos ar kitų nuo trombocitų priklausomų būklių gydyme.

Nepaisant pateiktų įrodymų apie kepenų veiksmingumo kraujodaroje, ypač trombopoezėje, vis dar išlieka keli esminiai klausimai. Koks yra kepenų reikšmingumas fiziologinėje trombocitų gamyboje, kaip kepenų mikroaplinka mobilizuojama atlikti kraujodaros funkcijas patologijos atveju, bei kokią vaidmenį jos atlieka kitų EMH organų atžvilgiu. Būtina atlikti papildomus tyrimus siekiant išsiaiškinti kokių mastu įvairių būklių atveju kepenys dalyvauja trombopoezėje, nes tai gali turėti reikšmingų pasekmių bandant manipuluoti trombocitų-megakariocitų ašimi klinikinėje praktikoje.

10. TROMBOPOEZĖ PLAČIUOSE

10.1 ISTORINĖ APŽVALGA

Ilgą laiką manyta, kad reikšmingiausia megakariocitų populiacija netrikdomos homeostazės metu lokalizuojasi kaulų čiulpuose. Tačiau apie megakariocitus ekstramedulinėse vietose buvo pranešama jau 1937 metais, kai Howell ir Donahue užfiksavo didėlius, į megakariocitus panašias ląsteles anestezuotų kačių ir šunų plaučiuose. [137] Kiti tyrimai užfiksavo megakariocitus triušių, žiurkių ir pelių plaučiuose bei žmonių plaučiuose. [138][139][140][141] Kallinikos-Maniatis ir kolegos bei Petersenas ir kolegos kiekybiškai įvertino vientisų ir nuogų megakariocitų buvimą arteriniame ir veniniame kraujyje. [139][142] Abiejuose tyrimuose pažymėta, kad iš plaučių išeinantis kraujas turėjo žymiai mažiau megakariocitų ir daugiau trombocitų lyginant su į plaučius įtekančiu krauju. [143] Ilgą laiką šie minėti tyrimai buvo stumiami nuošalin kaip fiziologiškai nereikšminga kazuistika, neturinčiais platesnės reikšmės žmogaus fiziologijoje. Kiti autoriai laikėsi nuomonės, jog megakariocitų aptikimas periferiniame kraujyje gali būti patologinės megakariopoezės onkologinių kraujo ligų atveju, EMH hemopoezės pasekmė, ar padidėjusio kraujagyslių praeinamumo pasekmė. [144] Tačiau dabar literatūroje stebimas didelis kiekis įtikinamų įrodymų apie plaučiuose esančią EMH nišą. Kokio masto trombopoezė vyksta plaučiuose, kaip ji vyksta, ir kokią fiziologinę reikšmę ji turi yra plačiai diskutuojami klausimai. Šių klausimų atsakymai neabejotinai turės reikšmės ateities tyrimams megakariocitų-trombocitų ašies, bei su ja susijusių patologinių būklių, detalizavimui.

Klasikinės EMH vietos – blužnis ir kepenys – jau apžvelgtos, bet ar plaučiai gali būti laikoma trečia tokio paties pobūdžio kraujodaros vieta vis dar yra stipriai diskutuotinas klausimas. Siekiant į jį atsakyti svarbu apžvelgti kelis esminius veiksnius, kurie nulemtų plaučių funkcinį pajėgumą

atliekant trombopoezę. Visų pirma, ar megakariocitai yra natyvinės plaučių ląstelės, o jeigu ne – kaip megakariocitai patenka į plaučius. Toliau, kokie įrodymai pagrindžia, kad plaučiuose vyksta fiziologiškai reikšminga trombopoezė. Galiausiai, kokie klausimai vis dar turi būti atsakyti norint tikslingai išspręsti šią diskusiją, bei kokia galėtų būti numatoma nauda klinikinėje praktikoje.

10.2 HEMOPOETINĖS KAMIENINĖS LĄSTELĖS IR MEGAKARIOCITAI PLAUČIUOSE

Bene pats aktualiausias klausimas, kurio atsakymai gali patvirtinti arba paneigti plaučiuose vykstančią fiziologiškai reikšmingą trombopoezę, yra HSC buvimas plaučiuose. Jeigu šių ląstelių funkcinė niša egzistuoja plaučiuose, tai reikštų, kad plaučiai nėra tiesiog EMH organas. 2017 metais Lefrancais ir kolegų atliktas tyrimas su pelėmis pateikė įtikinančių įrodymų, jog plaučiuose vyksta fiziologiškai reikšminga trombopoezė. [145] Tyrėjai parodė, kad pelių plaučiuose egzistavo funkciniai hemopoetiniai pirmtakai, galintys migruoti į kaulų čiulpus ir prisidėti prie trombopoezės atstatymo. Transplantuojant TPO kompetentingus plaučius į TPO receptoriaus neturinčias *c-mpl*^{-/-} peles, recipientų kaulų čiulpuose padidėjo megakariocitų pirmtakų skaičius, taip pat buvo atkurta hematopoetinių kamieninių ląstelių populiacija, panaikinant su *c-mpl*^{-/-} būkle susijusius trūkumus. Plaučiuose buvo aptikti hemopoetiniai pirmtakai, įskaitant ST-HSC, multipotentinius progenitorius (MPP2, MPP3/4), mieloidinius pirmtakus ir megakariocitinius pirmtakus, nors jų dažnis buvo mažesnis nei sveikų pelių kaulų čiulpuose ir blužnyje. Šios ląstelės buvo ekstravaskulinės ir funkciškai aktyvios, nes po transplantacijos į *c-mpl*^{-/-} recipientus sugebėjo įsitvirtinti kaulų čiulpuose ir iš dalies atkurti trombocitų skaičių. Šis atradimas metė iššūkį tradiciniam požiūriui, kad trombopoezė vyksta tik kaulų čiulpuose, ir leidžia manyti, jog plaučiuose esantys pirmtakai atliko iki tol neįvertintą vaidmenį palaikant hemopoetinę homeostazę. 2023 metais Yeung ir kolegės pranešė apie aptiktas HSC ląsteles pelių bei žmonių vaisių plaučiuose. [146] Naudojant *in vitro* užaugintas iš pelių bei žmonių vaisių plaučių eksplantatus, tyrėjai atliko tėkmės citometrijos tyrimus ir nustatė, jog jų mėginiuose stebimos ląstelės turi funkcinę gebėjimą atlikti *de novo* hemopoezę. 2023 metais Livada ir kolegės intraląstelinio biotino dažymo metodu pateikė įrodymų, jog megakariocitai ne tik yra pelių plaučiuose, bet ir išbūna juose ilgiau nei kaulų čiulpuose. [147] Tyrėjai stebėjo, jog jų dažyti megakariocitai plaučiuose gyvavo iki 4 mėnesių, lyginant su 7 dienomis kaulų čiulpuose. Be to, dažyti megakariocitai nepalikė plaučių, o tai nurodo galimą iki šiol dar nedetalizuotą signalinio kelią, kuris sustabdo megakariocitus plaučiuose. Kartu, šie tyrimai pateikia įtikinamų įrodymų, jog plaučiuose egzistuoja funkcinė HSC ląstelių niša, o tai prideda patikimumo plaučių kaip trombopoezės vietos teorijai. Visgi šie tyrimai nedetalizuoja kaip

plaučiuose gali vykti trombopoezė iš mechanistinės pusės, o tai palieka vietos dvejonėms. Kaulų čiulpuose vykstanti trombopoezė plačiai ištirta ir tiesiogiai aprašyta, o plaučiuose galimai vykstanti trombopoezė dar neturi to paties patikimumo lygio, kad būtų galima patikimai pasikliauti jos egzistavimu.

10.3 PLAUČIŲ KAPILIARAI KAIP TROMBOPOEZĖS VIETA

Kitas siūlomas plaučių trombopoezės mechanizmas yra senesnis ir remiasi tuo, kad megakariocitai yra didelės ląstelės, o plaučių kapiliarai siauri. Megakariocitų skersmuo svyruoja nuo 40 iki 70 mikrometrų, o plaučių kapiliarų skersmuo tesiekia 5 mikrometus. [148] Manoma, kad šių sąlygų dėka plaučiuose susidaro tinkamos mechaninės aplinkybės (šlytis, turbulencija) dėl kurių gali vykti trombopoezė. [149] Šiai teorijai HSC nišos plaučiuose nėra privalomos, kadangi daroma prielaida, kad megakariocitai į plaučius patenka per kraujotaką. Vienintelė šios teorijos sąlyga yra megakariocitų gebėjimas palikti kaulų čiulpus ir kraujo tėkmę pasiekti plaučių kapiliarus. Livada ir kolegos taip pat nustatė, kad naudojamuose pelių modeliuose plaučių megakariocitai buvo kilę iš kitokios HSC linijos negu tos pačios ląstelės kaulų čiulpuose. [147] Jų duomenimis apie 85% plaučiuose randamų megakariocitų buvo kilę iš Flt-3 (FMS-like tyrosine kinase 3) nepriklausomos linijos, o kaulų čiulpuose ir blužnyje buvo stebimi megakariocitai iš Flt-3 priklausomos linijos. Tyrėjai negalėjo pasakyti šio skirtumo priežasties, bet pateikė teoriją apie tai, kad kaulų čiulpuose gali būti skirtingi diferenciacijos keliai nuo kurių priklauso ar megakariocitui lemta likti kaulų čiulpuose ar migruoti į plaučius. Apie galimybę, jog šie megakariocitai galimai kilę iš HSC esančių plaučiuose šiame straipsnyje Livada ir kolegos nekalbėjo, kadangi tolimesniam plautinių megakariocitų kilmės išaiškinimui reiktų specifinių tyrimų. Lefrancais ir kolegos, remiantis savo *in vivo* pelių tyrimais, priėmė išvadą, jog kraujotakoje esantys megakariocitai dalyvavo trombopoezėje ramybės sąlygomis, o esamos plautinės HSC nišos buvo aktyvuojamos trombocitopenijos atvejais, bet ramybės metu aktyviai nedalyvavo trombopoezėje. [145]

10.4 PLAUČIAI KAIP PAGRINDINĖ TROMBOPOEZĖS VIETA

Pariser ir kolegos atliktas tyrimas susijęs su plaučių megakariocitų lokacijos identifikavimu rodo, jog megakariocitai daugiausia randami plaučių intersticiume. [150] Jeigu plaučių trombopoezė vyksta panašiu principu į kaulų čiulpuose stebimą procesą, tada ši lokacija nėra adekvačiai glaudi su kraujotaka ir dėl to gali paneigti plaučių trombopoezės reikšmę fiziologijoje. Visgi, reikšminga

megakariocitų populiacija plaučiuose turi atlikti kažkokią funkciją, jeigu ne trombopoezę. Sun ir kolegos teigia, kad plaučiuose stebimų megakariocitų transkripcinis profilis turi glaudų sąsają su imuninę funkciją turinčiomis ląstelėmis. [16] Kiti tyrimai prideda daugiau vertės šiai teorijai. Visų pirma, plaučių megakariocitai pasižymi HLA-DR bei adhezinių molekulių raiška, kuri didėja stimuliuojant su interferonu gama arba lipopolisacharidu. [150] Manoma, kad tai rodo jų funkciją reaguojant į uždegiminius stimulus.

Qui ir kolegų atliktas tyrimas pateikia tiesioginius mechanistinius įrodymus apie aktyvią megakariocitų ir trombocitų veiklą plaučiuose, įtvirtindamas plaučius kaip dinamišką trombopoezės vietą. [151] Naudojant intravitalinę dviejų fotonų mikroskopiją, buvo nustatyta, kad natyviniai alveoliniai megakariocitai greitai migruoja išilgai alveolių sienelių, fagocituodami įkvepiamas kietąsias daleles – tai kiekybiškai patvirtinta tėkmės citometrijos ir transmisinės elektroninės mikroskopijos duomenimis, rodančiais padidėjusį viduląstelinį dalelių kiekį megakariocituose, palyginti su tradiciniais fagocitais. Svarbu tai, kad šie aktyvuoti megakariocitai tyrimo metu atlieka dvejopą funkciją - imuninę atsaką bei trombopoezę. Tyrėjų duomenimis, kietąsias daleles fagocitavę megakariocitai perėjo į trombopoezę, išskyrė protrombocitus, kurie taip pat turėjo kietąsias daleles. Taipogi, šie trombocitai pasižymėjo sustiprintu sukibimu ir krešėjimo gebėjimais. Verta paminėti, jog šio tyrimo metu nebuvo diferencijuojama megakariocitų kilmė, todėl negalima pasakyti, ar tai plaučių *in situ* megakariocitai, ar iš kaulų čiulpų migravusios ląstelės. Nepaisant to, šie duomenys parodo, kad plaučiai yra aktyvus trombopoezinis organas, kuriame megakariocitai tiesiogiai dalyvauja tiek trombocitų gamyboje, tiek sisteminiam svetimkūnių šalinime.

2023 metais publikuotame straipsnyje Asquith ir kolegos teigia, kad plaučiai nėra svarbi trombopoezės vieta.[130] Šią nuomonę tyrėjai paremia savais vaizdavimo ir scRNR sekų tyrimais, kurie parodė mažą megakariocitų kiekį plaučiuose. Paminėtina, jog tyrėjų išvados paremtos CD41+ ląstelių aptikimu plaučiuose, o tai galėjo lemti per siaurą paieškos spektrą. Pariser ir kolegos bei Lefrancais ir kolegos parodė, jog plaučiuose randami megakariocitai gali turėti unikalų transkripcinį profilį, kuris nepanašus į klasikinį, kaulų čiulpuose randamą megakariocitų profilį.[150][147] Be to, megakariocitai gerai žinomi kaip sudėtingos ląstelės auginimui *in vitro* ir *in vitro* sąlygomis. Todėl Asquith ir kolegų išvada, jog nepavykus kultivuoti ir diferencijuoti plaučių kilmės megakariocitų reiškia, kad jų tikriausiai nėra, negali būti priimta be kritikos.[130] Įvairūs trombopoezei įtaką turintys veiksniai jau aptarti šioje apžvalgoje byloja tą patį – megakariopoezė ir trombopoezė yra sudėtingi procesai, ypač kalbant apie iki šiol mažai tirtą plaučių nišą. Asquith ir kolegos pažymi, jog šlytis didina protrombocitų gamybos dažnį, tačiau savo tyrime į tai neatsižvelgia.[130] Taip pat šių autorių modelis neintegruoja galimo plaučių vaidmens stresinėse situacijose, kuriose plaučiai taip pat gali turėti vaidmenį kaip EMH organas. Visumoje, Asquith ir kolegų argumentas prieš

plaučiuose esančią megakariocitų nišą bei vykstančią trombopoezę galutinai nepaneigia esamų įrodymų už plaučiuose vykstančią rambės trombopoezę ar už plaučius kaip „klasikinį“ EMH organą kaip blužnis.

Davis ir kolegų eksperimentiniai duomenys naudojant pelių modelius rodo, kad plaučiuose gaminamų trombocitų kiekis nėra fiziologiškai reikšmingas. [152] Ši komanda taip pat praneša apie mažą kiekį nuogų megakariocitų branduolių jų tirtuose plaučių mėginiuose, net po stiprios trombopoezės stimuliacijos. Kita vertus Potts ir kolegės nustatė, jog jų tiriamame pelių modelyje didžioji dauguma megakariocitų buvo pervaskulinėse kaulų čiulpų nišose, bet megakariocitų taip pat buvo ir plaučiuose, kur trombopoezė vyko rečiau (stebėjimo metu apie 1% plautinių megakariocitų vykdo trombopoezę) bet trombocitų gamyba vyko per protrombocitų gamybą. [88]

Iš klinikinės pusės įrodymai, jog trombopoezė gali vykti plaučiuose nėra vienareikšmiški. Iš vienos pusės, plaučių kapiliarinis tinklas siūlomas kaip „būgnų lazdelių“ pirštų po arterioveninių šuntų operacijų patogenezinė priežastis. [153] Megakariocitus ir jų fragmentus apeina plaučių kapiliarus, megakariocitai (arba dideli trombocitų fragmentai) pasiekia pirštų galiukus, atpalaiduojami augimo faktoriai, kurie stimuliuoja fibroblastus ir sukelia uždegimą. [154][155] Be to, yra vis daugiau įrodymų, rodančių, kad trombopoezės disreguliacija yra ūminio respiracinio sindromo priežastis, kuriai nebuvo priskirta jokia kita priežastis. [144] Autopsijos tyrimai iš pacientų sirgusių COVID-19 infekcija taip pat nurodo didelį alveolinių megakariocitų skaičių. [156] Iš kitos pusės argumentuojama, kad plaučiuose negali vykti reikšminga trombopoezė dėl to, kad pacientams, sergantiems plaučių ligomis tokiomis kaip lėtinė obstrukcinė plaučių liga, tuberkulioze, cistine fibroze, trombocitų kiekio sumažėjimas nestebimas. Priešingai, dažnai gali būti stebima trombocitozė. [157] Tolimesnių duomenų apie tai, kaip plaučių ligos paveikia trombopoezę šiuo metu nėra. Iš analizuotų straipsnių galima kelti hipotezę, jog ūminis plaučių pažeidimas, ypatingai infekcinės kilmės, turi reikšmingesnę įtaką trombopoezės procesui. Visgi, norint patvirtinti šią hipotezę reikia atsižvelgti į šiuo metu šiuo klausimu turimų duomenų skurdumą, bei palyginamųjų tyrimų tarp ūminių ir lėtinių neinfekcinių plaučių ligų atvejais vykstančios trombopoezės mechanizmo ir vietos.

10.5 PLAUCIUOSE VYKSTANČIOS TROMBOPOEZĖS REIKŠMINGUMAS

Plaučių trombopoezės reikšmingumo mastas yra ginčytinas. Kai kurie skaičiavimai rodo, kad plaučiai yra tik minimalios trombopoezės vieta. [130] Tačiau Lefrancais ir kolegės nurodė, kad jų duomenimis 50% visos trombocitų gamybos galimai vyksta plaučiuose. [145] Tyrėjai šį skaičių

gavo naudodami tiesioginį *in vivo* matą, kiek trombocitų išsiskiria iš kiekvieno megakariocito pelėse. Kituose šaltiniuose netiesiogiai apskaičiuoti įverčiai svyruoja nuo 40% iki 100%.

[158][140][139] Livada ir kolegų atliktame tyrime gauti duomenys rodo, jog ramybės metu plaučių kilmės trombocitai sudaro 5-10% visų trombocitų, o streso (ūminės ir lėtinės infekcijos atvejais) šis skaičius išauga iki maždaug 20%. [147] Paminėtina, jog šis tyrimas nebuvo paremtas tiesioginiu stebėjimu, o pasiklioję tyrėjų duomenimis apie tai, kad plaučiuose esantys megakariocitai yra kilę iš Flt-3 nepriklausomo diferenciacijos kelio. Visgi tai pirmas didelio masto tyrimas kuris identifikuoja plaučių megakariocitų indelį į bendrą trombocitų skaičių tiek ramybės, tiek streso atveju. Taip parodoma, kad plaučiuose vykstanti trombopoezė reaguoja į stresą, galimai turi sąsają su uždegiminių procesų jutimu, bei reaguoja į uždegiminius signalus per trombopoezės proceso reguliavimą.

Galiausiai, Asquith ir kolegos kelia svarbius klausimus dėl megakariocitų buvimo plaučiuose, tačiau jų duomenys nėra pakankamai patikimi galutinėms išvadoms priimti ir primti, jog plaučiai nėra reikšminga trombopoezės vieta.[130] Vietoj to, kad atmesdami plaučių megakariocitus remtųsi ribotais detekcijos metodais, ateities tyrimai turėtų naudoti platesnę transkriptomiką ir funkcinę analizę, kad patikslintų mūsų supratimą apie jų vaidmenį sisteminėje trombocitų homeostazėje.

11. DISKUSIJA IR IŠVADOS

Ilgą laiką buvo manoma, kad trombopoezės reguliavimas daugiausia priklauso nuo TPO. Vis dėlto, pastaraisiais metais daugėja įrodymų, kad toks vieno faktoriaus modelis neatspindi viso megakariocitų-trombocitų ašies reguliacijos sudėtingumo. TPO reikšmė išlieka neginčijama, tačiau vis labiau pripažįstama, kad šio hormono poveikis priklauso nuo kitų moduluojančių veiksnių, tokių kaip nišos mikroaplinka, citokinų, augimo faktorių, mechaninių jėgų, bei imuninės sistemos. Ši daugiasluoksnė reguliacija išryškėja ir klinikinėje praktikoje. Nors TPO receptorių agonistai pasitiesino gydant tam tikras trombocitopenijos formas, jų taikymas platesniam trombocitopenijų spektrui yra ribotas. Tai rodo, kad vien tik TPO stimuliacijos nepakanka efektyviam trombocitų gamybos atkūrimui. Todėl vis didesnę reikšmę įgauna sisteminis, etapais grindžiamas požiūris į visą megakariocitų-trombocitų ašį, siekiant tiksliai identifikuoti galimus naujus farmakologinius taikinius.

Plaučiuose randamų megakariocitų reikšmės interpretacija išlieka prieštaringa: kai kurie autoriai juos vertina kaip fiziologiškai reikšmingą trombocitų šaltinį, o kiti – EMH išraišką, aktyvuojamą esant patologinėms būklėms. Literatūroje pateikiami argumentai palaikantys abi nuomones, tačiau

vienareikšmiško atsakymo šiuo metu pateikti negalima – tam būtini tolimesni tikslingi tyrimai. Nors šiame darbe analizuojami tik trombopoezės mechanizmai ir lokalizacija, vis daugiau naujų tyrimų kelia klausimų dėl megakariocitų svarbos imuninės sistemos veikloje. Tai ypač aktualu plaučiuose, kur megakariocitai kai kuriais atvejais vertinami ne tiek kaip trombocitų šaltiniai, kiek kaip imuninio atsako dalyviai. Nustatyta, kad specifiniai megakariocitų pogrupiai plaučiuose aktyviai sąveikauja su neutrofilais, makrofagais ir T ląstelėmis, o jų skaičius reikšmingai padidėja infekcijų metu. [159] Šios įžvalgos rodo besikeičiantį požiūrį į megakariocitų vaidmenį žmogaus organizme, o jų reikšmė trombopoezės kontekste dar nėra aiškiai apibrėžta ir reikalauja tolimesnių duomenų bei tyrimų.

Dabartinėse publikacijose, nagrinėjančiose megakariocitų-trombocitų sąsają bei trombopoezės lokaciją, dažnai iš anksto laikomasi vienos iš dviejų pozicijų – plaučiai interpretuojami kaip aktyvus hemopoetinis organas arba tik kaip antrinė, kompensacinė niša. Tačiau esamų įrodymų kokybė kol kas neleidžia formuoti tvirto mokslinio konsensuso. Be to, daugelis tyrimų vertina megakariocitų buvimą ar aktyvumą viename konkrečiame kontekste (pavyzdžiui, infekcijos, transplantacijos sepsio), neatsižvelgiant į megakariocitų-trombocitų sąsąją kaip sisteminę visumą, kuri veikia kaip vienas bendras nozologinis vienetas. [89] Be abejonės, turi būti atliekami tyrimai kurie objektyviai nagrinėtų galimybę, jog plaučiuose vykstanti trombopoezė gali būti fiziologiškai reikšminga.

Trombopoezės vieta gali būti daugiau nei tik pasyvi aplinka, kurioje vyksta trombocitų gamyba. Kitaip tariant, lokalizacija gali turėti tiesioginį ir reikšmingą poveikį pačiam trombopoezės mechanizmui. Tyrimų verta hipotezė, kad mikroaplinka, kurioje formuojasi trombocitai, galėtų būti esminis veiksnys, lemiantis ne tik trombocitų kiekį, bet ir jų funkcionalumui. Pavyzdžiui, EMH vietose vykstanti trombopoezė gali skirtis nuo kaulų čiulpų, dėl šiose nišose esančių mikroaplinkos veiksnių, galinčių modifikuoti trombopoezės eigą. Ar šie procesai skiriasi nuo „standartinio“ trombopoezės modelio - vis dar atviras klausimas. Iš tiesų, pats „standartinis“ trombopoezės modelis nėra iki galo aiškus, kadangi šioje srityje vis dar vyksta intensyvios mokslinės diskusijos ir tyrimai. Tikėtina, jog tiesa slypi tarp dviejų pagrindinių teorijų: duomenų už paviršinio pumpuravimo teoriją ir protrombocitų teoriją yra gausu, visgi tyrimai turėtų kryptingai tirti šių mechanizmų buvimą ar nebuvimą *in vivo* modeliuose.

Kita vertus, jeigu atveriamos durys apie diskusijas į EMH nišas specifiškai kaip adaptacines esant streso atvejams, tuomet neišvengiamai kyla klausimas ar tai išties atspindi specifinį atsaką į stresą, ar fiziologinės normos amplifikaciją [160]. Šio klausimo atsakyti negalima kol nebus adekvačiai detalizuoti megakariocitų-trombocitų sąsajos reguliacijos keliai, megakariocitų migravimo galimybės, bei HSC nišų vietos už kaulų čiulpų ribų.

Trombopoezės mechanizmo tyrimai susiduria su modelių pasirinkimo problemomis. Nors pelės yra plačiausiai naudojamas modelis hemopoezės tyrimuose, jų taikymas megakariocitų-trombocitų ašies analizėje kelia vis daugiau klausimų. Nepaisant to, kad pelių tyrimai padėjo identifikuoti daugelį esminių kraujodaros mechanizmų, šių gyvūnų fiziologiniai skirtumai nuo žmonių verčia atsargiai vertinti duomenų atitikimą žmogaus modeliuose. Tai ypač aktualu atsižvelgiant į tai, kad trombopoezė yra itin sudėtinga ir dinamiška sistema. Jos eiga priklauso ne tik nuo žinomų reguliatorių, bet ir nuo dar ne iki galo identifikuotų signalų perdavimo kelių, nišų mikroaplinkos savybių, bei sisteminių organizmo būklių. Tokia daugiapakopė kontrolė apsunkina mechanizmų atkūrimą *in vitro* ar modeliuose, kurie neišvengiamai supaprastina realias fiziologines sąlygas.

Atsižvelgiant į šiuos ribotumus, vis aktyviau ieškoma alternatyvų. *Ex vivo* bioreaktoriai leidžia tirti trombopoezę labiau kontroliuojamoje, bet kartu ir fiziologiškai artimesnėje aplinkoje. Nors šie metodai dar nėra tobuli ar plačiai prieinami, jie žymi reikšmingą poslinkį nuo gyvūnų modelių link labiau žmogaus biologijai artimesnių tyrimų.

Siekiant tikros pažangos būtina ne tik kaupti duomenis, bet ir sutarti dėl pagrindinių sąvokų bei modelių. [89] Kol nebus aiškiai apibrėžta, kas iš tiesų sudaro megakariocitų-trombocitų ašies veikimo mechanizmą, tol nei eksperimentiniai modeliai, nei terapinės intervencijos negalės būti taikomos visapusiškai. Trombopoezė nėra vien tik procesas – tai sudėtinga biologinė sistema, kurios interpretavimas reikalauja tiek tikslių tyrimų, tiek teorinio nuoseklumo. Tik tokiu keliu galima nutiesti tiltą tarp esminių įžvalgų ir realios klinikinės naudos.

12. ŠALTINIAI

1. Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol* [Internet]. 2013;201(6):785–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201304054>
2. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* [Internet]. 2016;351(6269):aab2116. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aab2116>
3. Carrelha J, Meng Y, Kettyle LM, Luis TC, Norfo R, Alcolea V, et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature* [Internet]. 2018;554(7690):106–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature25455>
4. Rodriguez-Fraticelli AE, Wolock SL, Weinreb CS, Panero R, Patel SH, Jankovic M, et al. Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature* [Internet]. 2018;553(7687):212–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature25168>
5. Pinho S, Marchand T, Yang E, Wei Q, Nerlov C, Frenette PS. Lineage-biased hematopoietic stem cells are regulated by distinct niches. *Dev Cell* [Internet]. 2018;44(5):634–641.e4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.016>
6. Mazzi S, Lordier L, Debili N, Raslova H, Vainchenker W. Megakaryocyte and polyploidization. *Exp Hematol* [Internet]. 2018;57:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2017.10.001>
7. Cunin P, Nigrovic PA. Megakaryocytes as immune cells. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2019;105(6):1111–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.mr0718-261rr>
8. Murone M, Carpenter DA, de Sauvage FJ. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells* [Internet]. 1998;16(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.160001>

9. Grover A, Sanjuan-Pla A, Thongjuea S, Carrelha J, Giustacchini A, Gambardella A, et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7(1):11075. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11075>
10. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med* [Internet]. 2014;20(11):1321–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3706>
11. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med* [Internet]. 2014;20(11):1315–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3707>
12. Zhao M, Ross JT, Itkin T, Perry JM, Venkatraman A, Haug JS, et al. FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system. *Blood* [Internet]. 2012;120(9):1831–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-11-393991>
13. Puhm F, Laroche A, Boilard E. Diversity of megakaryocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2023;43(11):2088–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.123.318782>
14. Liu H, Welburn JPI. A circle of life: platelet and megakaryocyte cytoskeleton dynamics in health and disease. *Open Biol* [Internet]. 2024;14(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.240041>
15. Wang D, Xie J, Zhao M. Versatility of megakaryocytes in homeostasis and disease. *Blood Sci* [Internet]. 2024;6(4):e00212. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/bs9.0000000000000212>
16. Sun S, Jin C, Si J, Lei Y, Chen K, Cui Y, et al. Single-cell analysis of ploidy and the transcriptome reveals functional and spatial divergency in murine megakaryopoiesis. *Blood* [Internet]. 2021;138(14):1211–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2021010697>
17. Liu C, Wu D, Xia M, Li M, Sun Z, Shen B, et al. Characterization of cellular heterogeneity and an immune subpopulation of human megakaryocytes. *Adv Sci (Weinh)* [Internet]. 2021;8(15). Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/advs.202100921>
18. Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythemic sera. *Acta Haematol (Basel)*. 1958;20:350–5.
19. Kuter DJ, Beeler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoeitin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994;91(23):11104–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.23.11104>
20. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* [Internet]. 1994;369(6481):533–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/369533a0>
21. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, et al. cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* [Internet]. 1994;369(6481):571–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/369571a0>
22. Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, et al. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* [Internet]. 1994;353(1):57–61. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01008-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(94)01008-0)
23. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, et al. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* [Internet]. 1994;369(6481):565–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/369565a0>
24. Choi ES, Hokom M, Bartley T, Li YS, Ohashi H, Kato T, et al. Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro. *Stem Cells* [Internet]. 1995;13(3):317–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.5530130313>
25. Ito T, Ishida Y, Kashiwagi R, Kuriya S. Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes. *Br J Haematol* [Internet]. 1996;94(2):387–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1813.x>
26. Marcucci R, Romano M. Thrombopoietin and its splicing variants: Structure and functions in thrombopoiesis and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 2008;1782(7–8):427–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.03.007>
27. Tsutsumi N, Masoumi Z, James SC, Tucker JA, Winkelmann H, Grey W, et al. Structure of the thrombopoietin-MPL receptor complex is a blueprint for biasing hematopoiesis. *Cell* [Internet]. 2023;186(19):4189–4203.e22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.037>
28. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2007;1(6):685–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.020>
29. Alasmari BG, Elzubair K, Alquraishi A, Adlan M, Alabbas A, Elzubair L, et al. A rare THPO gene mutation in a Saudi female child: A case report and literature review. *Cureus* [Internet]. 2024; Available from: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.70513>
30. Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R, Endo H, Nakamura S, Dohda T, et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *J Clin Invest* [Internet]. 2013;123(9):3802–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI64721>

31. Malara A, Abbonante V, Di Buduo CA, Tozzi L, Currao M, Balduini A. The secret life of a megakaryocyte: emerging roles in bone marrow homeostasis control. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2015;72(8):1517–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-014-1813-y>
32. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* [Internet]. 2001;98(9):2720–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v98.9.2720>
33. Lim HI, Cuker A. Thrombocytopenia and liver disease: pathophysiology and periprocedural management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2022;2022(1):296–302. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/hematology.2022000408>
34. Falet H, Hoffmeister KM. Elevating TPO production up a notch. *Blood* [Internet]. 2024;143(26):2684–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2024024907>
35. Bussel JB, Soff G, Balduzzi A, Cooper N, Lawrence T, Semple JW. A review of romiplostim mechanism of action and clinical applicability. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2021;15:2243–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S299591>
36. Jang JH, Tomiyama Y, Miyazaki K, Nagafuji K, Usuki K, Uoshima N, et al. Efficacy and safety of romiplostim in refractory aplastic anaemia: a Phase II/III, multicentre, open-label study. *Br J Haematol* [Internet]. 2021;192(1):190–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/bjh.17190>
37. Tezuka Y, Onoda N, Morishima T, Sumitomo Y, Nishii K, Takizawa H, et al. Expansion effect of romiplostim on hematopoietic stem and progenitor cells versus thrombopoietin and eltrombopag. *Int J Hematol* [Internet]. 2024;120(5):575–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12185-024-03853-6>
38. 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* [Internet]. 1997;139(2):449–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.139.2.449>
39. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* [Internet]. 2008;112(8):3164–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-03-144956>
40. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte–platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2012;9(11):658–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2012.131>
41. Kaushansky K. Thrombopoietin and its receptor in normal and neoplastic hematopoiesis. *Thromb J* [Internet]. 2016;14(Suppl 1):40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12959-016-0095-z>
42. Gainsford T, Roberts AW, Kimura S, Metcalf D, Dranoff G, Mulligan RC, et al. Cytokine production and function in c-mpl-deficient mice: no physiologic role for interleukin-3 in residual megakaryocyte and platelet production. *Blood* [Internet]. 1998;91(8):2745–52. Available from: http://dx.doi.org/10.1182/blood.v91.8.2745.2745_2745_2752
43. Wang Z, Zhang Y, Kamen D, Lees E, Ravid K. Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis. *Blood* [Internet]. 1995;86(10):3783–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.v86.10.3783.bloodjournal86103783>
44. Sun S, Zimmet JM, Toselli P, Thompson A, Jackson CW, Ravid K. Overexpression of cyclin D1 moderately increases ploidy in megakaryocytes. *Haematologica*. 2001;86(1):17–23.
45. Geng Y, Yu Q, Sicinska E. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*. 2003;114:431–43.
46. Liu Z-J, Italiano J Jr, Ferrer-Marin F, Gutti R, Bailey M, Poterjoy B, et al. Developmental differences in megakaryocytopoiesis are associated with up-regulated TPO signaling through mTOR and elevated GATA-1 levels in neonatal megakaryocytes. *Blood* [Internet]. 2011;117(15):4106–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-293092>
47. Hegyi E, Navarro S, Debili N, Mouthon MA, Katz A, Breton-Gorius J, et al. Regulation of human megakaryocytopoiesis: analysis of proliferation, ploidy and maturation in liquid cultures. *Int J Cell Cloning* [Internet]. 1990;8(4):236–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.5530080407>
48. Podolak-Dawidziak M, Hancock V, Lechuk R, Kotlarek-Haus S, Martin JF. The expression of mRNA for fibrinogen in megakaryocytes isolated from patients with T-cell lymphoma. *Br J Haematol* [Internet]. 1995;91(2):362–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05304.x>
49. Machlus KR, Italiano JE Jr. Megakaryocyte development and platelet formation. In: *Platelets*. Elsevier; 2019. p. 25–46.
50. Shaklai M, Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *J Ultrastruct Res* [Internet]. 1978;62(3):270–85. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5320\(78\)80023-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-5320(78)80023-9)
51. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*. 1982;60(1):213–9.
52. Paulus JM, Bury J, Grosdent JC. Control of platelet territory development in megakaryocytes. *Blood Cells*. 1979;5(1):59–88.
53. Decker M, Leslie J, Liu Q, Ding L. Hepatic thrombopoietin is required for bone marrow hematopoietic stem cell maintenance. *Science* [Internet]. 2018;360(6384):106–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aap8861>

54. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med* [Internet]. 2004;10(1):64–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm973>
55. Takasaki K, Chou ST. GATA1 in normal and pathologic megakaryopoiesis and platelet development. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer Nature Switzerland; 2024. p. 261–87.
56. Gaertner F, Ishikawa-Ankerhold H, Stutte S, Fu W, Weitz J, Dueck A, et al. Plasmacytoid dendritic cells control homeostasis of megakaryopoiesis. *Nature* [Internet]. 2024;631(8021):645–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-024-07671-y>
57. Scherlinger M, Richez C, Tsokos GC, Boilard E, Blanco P. The role of platelets in immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2023;23(8):495–510. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-023-00834-4>
58. Martin JF, Trowbridge EA, Salmon GL, Slater DN. The relationship between platelet and megakaryocyte volumes. *Thromb Res* [Internet]. 1982;28(4):447–59. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848\(82\)90162-1](http://dx.doi.org/10.1016/0049-3848(82)90162-1)
59. McArthur K, Chappaz S, Kile BT. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood* [Internet]. 2018;131(6):605–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2017-11-742684>
60. Aster RH. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of “hypersplenic” thrombocytopenia. *J Clin Invest* [Internet]. 1966;45(5):645–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI105380>
61. Ivanovna Gabrilchak A, Anatolieva Gussyakova O, Aleksandrovich Antipov V, Alekseevna Medvedeva E, Leonidovna Tukshumskaya L. A modern overview of the process of platelet formation (thrombocytopoiesis) and its dependence on several factors. *Biochem Med (Zagreb)* [Internet]. 2024;34(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.11613/bm.2024.030503>
62. Gerrard JM, White JG, Peterson DA. The platelet dense tubular system: Its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thromb Haemost* [Internet]. 1978;40(02):224–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0038-1648656>
63. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* [Internet]. 2009;23(4):177–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001>
64. Bugert P, Dugrillon A, Günaydin A, Eichler H, Klüter H. Messenger RNA profiling of human platelets by microarray hybridization. *Thromb Haemost*. 2003;90(4):738–48.
65. Gnatenko DV, Dunn JJ, McCorkle SR, Weissmann D, Perrotta PL, Bahou WF. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. *Blood* [Internet]. 2003;101(6):2285–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-09-2797>
66. Vieira-de-Abreu A, Campbell RA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2012;34(1):5–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-011-0286-4>
67. Renaud B, Buda M, Lewis BD, Pujol J-F. Effects of 5,6-dihydroxytryptamine on tyrosine-hydroxylase activity in central catecholaminergic neurons of the rat. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 1975;24(18):1739–42. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(75\)90018-0](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(75)90018-0)
68. D’Ambrosi S, Nilsson RJ, Wurdinger T. Platelets and tumor-associated RNA transfer. *Blood* [Internet]. 2021;137(23):3181–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2019003978>
69. Beaulieu L, Tanriverdi K, Freedman J, Clancy L. The role of RNA uptake in platelet heterogeneity. *Thromb Haemost* [Internet]. 2017;117(05):948–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1160/th16-11-0873>
70. El-Kadiry AE-H, Merhi Y. The role of the proteasome in platelet function. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(8):3999. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22083999>
71. Londin ER, Hatzimichael E, Loher P, Edelstein L, Shaw C, Delgrosso K, et al. The human platelet: strong transcriptome correlations among individuals associate weakly with the platelet proteome. *Biol Direct* [Internet]. 2014;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6150-9->
72. Ingram M, Coopersmith A. Reticulated Platelets following Acute Blood Loss. *Br J Haematol* [Internet]. 1969;17(3):225–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1969.tb01366.x>
73. Bodrova VV, Shustova ON, Khaspekova SG, Mazurov AV. Platelet reticulated forms, size indexes and functional activity. Interactions in healthy volunteers. *Platelets* [Internet]. 2022;33(3):398–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2021.1922659>
74. Hille L, Lenz M, Vlachos A, Grüning B, Hein L, Neumann F-J, et al. Ultrastructural, transcriptional, and functional differences between human reticulated and non-reticulated platelets. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2020;18(8):2034–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.14895>
75. Bongiovanni D, Santamaria G, Klug M, Santovito D, Felicetta A, Hristov M, et al. Transcriptome analysis of reticulated platelets reveals a prothrombotic profile. *Thromb Haemost* [Internet]. 2019;119(11):1795–806. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0039-1695009>
76. Harrison P, Goodall AH. “Message in the platelet”--more than just vestigial mRNA! *Platelets* [Internet]. 2008;19(6):395–404. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09537100801990582>

77. Armstrong PC, Hoefler T, Knowles RB, Tucker AT, Hayman MA, Ferreira PM, et al. Newly formed reticulated platelets undermine pharmacokinetically short-lived anti-platelet therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2017;37(5):949–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308763>
78. Bernlochner I, Goedel A, Plischke C, Schüpke S, Haller B, Schulz C, et al. Impact of immature platelets on platelet response to ticagrelor and prasugrel in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J* [Internet]. 2015;36(45):3202–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehv326>
79. Periyah MH, Halim AS, Mat Saad AZ. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2017;11(4):319–27.
80. Carestia A, Godin LC, Jenne CN. Step up to the platelet: Role of platelets in inflammation and infection. *Thromb Res* [Internet]. 2023;231:182–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2022.10.001>
81. Zheng XL. ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Annu Rev Med* [Internet]. 2015;66(1):211–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-061813-013241>
82. Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011;11(4):264–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2956>
83. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. *Circ Res* [Internet]. 2018;122(2):337–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310795>
84. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2012;8(9):534–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2012.118>
85. Linge P, Fortin PR, Lood C, Bengtsson AA, Boilard E. The non-haemostatic role of platelets in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2018;14(4):195–213. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2018.38>
86. Bravaccini S, Boldrin E, Gurioli G, Tedaldi G, Piano MA, Canale M, et al. The use of platelets as a clinical tool in oncology: opportunities and challenges. *Cancer Lett* [Internet]. 2024;607(217044):217044. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2024.217044>
87. Wright J. The origin and nature of blood platelets. *Boston Med Surg J* [Internet]. 1906;154:643–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM190606071542301>
88. Potts KS, Farley A, Dawson CA, Rimes J, Biben C, de Graaf C, et al. Membrane budding is a major mechanism of in vivo platelet biogenesis. *J Exp Med* [Internet]. 2020;217(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20191206>
89. Tilburg J, Becker IC, Italiano JE. Don't you forget about me(gakaryocytes). *Blood* [Internet]. 2022;139(22):3245–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2020009302>
90. Stegner D, vanEeuwijk JMM, Angay O, Gorelashvili MG, Semeniak D, Pinnecker J, et al. Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00201-7>
91. Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* [Internet]. 2007;317(5845):1767–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1146304>
92. Brown E, Carlin LM, Nerlov C, Lo Celso C, Poole AW. Multiple membrane extrusion sites drive megakaryocyte migration into bone marrow blood vessels. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2018;1(2):e201800061. Available from: <http://dx.doi.org/10.26508/lsa.201800061>
93. Bornert A, Boscher J, Pertuy F, Eckly A, Stegner D, Strassel C, et al. Cytoskeletal-based mechanisms differently regulate in vivo and in vitro proplatelet formation. *Haematologica* [Internet]. 2020;106(5):1368–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2019.239111>
94. Stone AP, Nikols E, Freire D, Machlus KR. The pathobiology of platelet and megakaryocyte extracellular vesicles: A (c)lot has changed. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2022;20(7):1550–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jth.15750>
95. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)* [Internet]. 1957;29(3):267–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000141169>
96. 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* [Internet]. 1976;145(2):183–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/aja.1001450204>
97. Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJM, et al. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* [Internet]. 1995;81(5):695–704. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90531-6](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90531-6)
98. Kyriakides TR, Rojnuckarin P, Reidy MA, Hankenson KD, Papayannopoulou T, Kaushansky K, et al. Megakaryocytes require thrombospondin-2 for normal platelet formation and function. *Blood* [Internet]. 2003;101(10):3915–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V101.10.3915>

99. Zhang L, Orban M, Lorenz M, Barocke V, Braun D, Urtz N, et al. A novel role of sphingosine 1-phosphate receptor S1pr1 in mouse thrombopoiesis. *J Exp Med* [Internet]. 2012;209(12):2165–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20121090>
100. Hussein K, Stucki-Koch A, Göhring G, Kreipe H, Suttrop M. Increased megakaryocytic proliferation, proplatelet deposition and expression of fibrosis-associated factors in children with chronic myeloid leukaemia with bone marrow fibrosis. *Leukemia* [Internet]. 2017;31(7):1540–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.73>
101. Becker IC, Wilkie AR, Nikols E, Carminita E, Roweth HG, Tilburg J, et al. Cell cycle-dependent centrosome clustering precedes proplatelet formation. *Sci Adv* [Internet]. 2024;10(25). Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.adl6153>
102. Pongérard A, Mallo L, Do Sacramento V, Boiron O, Eckly A, Gachet C, et al. Development of an efficient, ready to use, blood platelet-release device based on two new flow regime parameters: The periodic hydrodynamic loading and the shear stress accumulation. *N Biotechnol* [Internet]. 2023;77:68–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2023.07.002>
103. Arai T, Shiga Y, Mukai M, Takayama N, Tashiro S, Tajiri I, et al. Osteogenic effects and safety of human induced pluripotent stem cell-derived megakaryocytes and platelets produced on a clinical scale. *Regen Ther* [Internet]. 2024;26:850–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reth.2024.09.012>
104. Baigger A, Blasczyk R, Figueiredo C. Towards the manufacture of megakaryocytes and platelets for clinical application. *Transfus Med Hemother* [Internet]. 2017;44(3):165–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000477261>
105. Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol*. 2015;209(3):453–66.
106. Kosaki G. In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets? *Int J Hematol* [Internet]. 2005;81(3):208–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1532/IJH97.04177>
107. Trowbridge EA, Harley PJ. A computer model of the random binary sequential division of megakaryocyte cytoplasm to produce platelets. *Phys Med Biol* [Internet]. 1984;29(12):1477–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/29/12/002>
108. Coşkun S, Chao H, Vasavada H, Heydari K, Gonzales N, Zhou X, et al. Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell Rep* [Internet]. 2014;9(2):581–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.013>
109. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017;17(9):573–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2017.53>
110. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* [Internet]. 2013;502(7473):637–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12612>
111. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* [Internet]. 2005;121(7):1109–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026>
112. Sena IFG, Prazeres PHDM, Santos GSP, Borges IT, Azevedo PO, Andreotti JP, et al. Identity of Gli1+ cells in the bone marrow. *Exp Hematol* [Internet]. 2017;54:12–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2017.06.349>
113. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, Henley KJ, Ellis S, Lebois M, et al. Mcl-1 and Bcl-xL coordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood* [Internet]. 2012;119(24):5850–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-12-398834>
114. Zhou BO, Ding L, Morrison SJ. Hematopoietic stem and progenitor cells regulate the regeneration of their niche by secreting Angiopoietin-1. *Elife* [Internet]. 2015;4:e05521. Available from: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.05521>
115. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature* [Internet]. 2016;532(7599):323–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature17624>
116. Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, et al. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013;12(6):737–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.001>
117. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* [Internet]. 2010;466(7308):829–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09262>
118. Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, Wang Z, Fernandez NF, Birbair A, et al. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2017;19(3):214–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3475>
119. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* [Internet]. 2003;425(6960):836–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02041>

120. Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development* [Internet]. 2014;141(24):4656–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.106575>
121. Di Buduo CA, Wray LS, Tozzi L, Malara A, Chen Y, Ghezzi CE, et al. Programmable 3D silk bone marrow niche for platelet generation ex vivo and modeling of megakaryopoiesis pathologies. *Blood* [Internet]. 2015;125(14):2254–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-08-595561>
122. Jiang J, Woulfe DS, Papoutsakis ET. Shear enhances thrombopoiesis and formation of microparticles that induce megakaryocytic differentiation of stem cells. *Blood* [Internet]. 2014;124(13):2094–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2014-01-547927>
123. Abbonante V, Di Buduo CA, Gruppi C, De Maria C, Spedden E, De Acutis A, et al. A new path to platelet production through matrix sensing. *Haematologica* [Internet]. 2017;102(7):1150–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2016.161562>
124. Shin J-W, Swift J, Spinler KR, Discher DE. Myosin-II inhibition and soft 2D matrix maximize multinucleation and cellular projections typical of platelet-producing megakaryocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011;108(28):11458–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1017474108>
125. Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, et al. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature* [Internet]. 2015;527(7579):466–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature15530>
126. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* [Internet]. 2012;481(7382):457–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10783>
127. Craddock CG Jr, Adams WS, Perry S, Lawrence JS. The dynamics of platelet production as studied by a depletion technique in normal and irradiated dogs. *J Lab Clin Med*. 1955;45(6):906–19.
128. Cronkite EP. Regulation of platelet production: Homeostatic Mechanisms. *Brookhaven Symposia in Biology*. 1958;(10).
129. Davis E, Corash L, Baker G, Mok Y, Hill RJ, Levin J. Splenic thrombopoiesis after bone marrow ablation with radiostrontium: a murine model. *J Lab Clin Med*. 1990;116(6):879–88.
130. Asquith NL, Carminita E, Camacho V, Rodriguez-Romera A, Stegner D, Freire D, et al. The bone marrow is the primary site of thrombopoiesis. *Blood* [Internet]. 2024;143(3):272–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2023020895>
131. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* [Internet]. 2008;132(4):631–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>
132. Besancenot R, Chaligné R, Tonetti C, Pasquier F, Marty C, Lécluse Y, et al. A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation. *PLoS Biol* [Internet]. 2010;8(9):e1000476. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000476>
133. Davenport P, Liu Z-J, Sola-Visner M. Fetal vs adult megakaryopoiesis. *Blood* [Internet]. 2022;139(22):3233–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2020009301>
134. Tanizaki Y, Ichisugi M, Obuchi-Shimoji M, Ishida-Iwata T, Tahara-Mogi A, Meguro-Ishikawa M, et al. Thrombopoietin induces production of nucleated thrombocytes from liver cells in *Xenopus laevis*. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep18519>
135. Gilbert-Barness EF, Kenison K, Giulian G, Chandra S. Extramedullary hematopoiesis in the liver in sudden infant death syndrome. *Arch Pathol Lab Med*. 1991;115(3):226–9.
136. Chernak BJ, Rampal RK. Extramedullary hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms: Pathophysiology and treatment strategies. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier; 2021. p. 97–116.
137. Howell WH, Donahue DD. The production of blood platelets in the lungs. *J Exp Med* [Internet]. 1937;65(2):177–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.65.2.177>
138. Jordan HE. The origin and significance of the megakaryocytes of the lungs. *Anat Rec* [Internet]. 1940;77(1):91–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1090770109>
139. Pedersen NT. The pulmonary vessels as a filter for circulating megakaryocytes in rats. *Scand J Haematol* [Internet]. 1974;13(3):225–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.1974.tb00263.x>
140. Zucker-Franklin D, Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed. *Am J Pathol* [Internet]. 2000;157(1):69–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64518-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64518-x)
141. Aabo K, Hansen KB. Megakaryocytes in pulmonary blood vessels. I. Incidence at autopsy, clinicopathological relations especially to disseminated intravascular coagulation. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1978;86(4):285–91.
142. Kallinikos-Maniatis A. Megakaryocytes and platelets in central venous and arterial blood. *Acta Haematol* [Internet]. 1969;42(6):330–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000208817>
143. Levine RF, Eldor A, Shoff PK, Kirwin S, Tenza D, Cramer EM. Circulating megakaryocytes: Delivery of large numbers of intact, mature megakaryocytes to the lungs. *Eur J Haematol* [Internet]. 1993;51(4):233–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.1993.tb00637.x>

144. Frydman GH, Ellett F, Jorgensen J, Marand AL, Zukerberg L, Selig MK, et al. Megakaryocytes respond during sepsis and display innate immune cell behaviors. *Front Immunol* [Internet]. 2023;14. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1083339>
145. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* [Internet]. 2017;544(7648):105–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21706>
146. Yeung AK, Villacorta-Martin C, Lindstrom-Vautrin J, Belkina AC, Vanuytsel K, Dowrey TW, et al. De novo hematopoiesis from the fetal lung. *Blood Adv* [Internet]. 2023;7(22):6898–912. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/bloodadvances.2022008347>
147. Livada AC, Pariser DN, Morrell CN. Megakaryocytes in the lung: History and future perspectives. *Res Pract Thromb Haemost* [Internet]. 2023;7(2):100053. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100053>
148. Bertović I, Bura A, Jurak Begonja A. Developmental differences of in vitro cultured murine bone marrow- and fetal liver-derived megakaryocytes. *Platelets* [Internet]. 2022;33(6):887–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2021.2007869>
149. Ito Y, Nakamura S, Sugimoto N, Shigemori T, Kato Y, Ohno M, et al. Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale ex vivo production. *Cell* [Internet]. 2018;174(3):636–648.e18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.011>
150. Pariser DN, Hilt ZT, Ture SK, Blick-Nitko SK, Looney MR, Cleary SJ, et al. Lung megakaryocytes are immune modulatory cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2021;131(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI113737>
151. Qiu J, Ma J, Dong Z, Ren Q, Shan Q, Liu J, et al. Lung megakaryocytes engulf inhaled airborne particles to promote intrapulmonary inflammation and extrapulmonary distribution. *Nat Commun* [Internet]. 2024;15(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-51686-y>
152. Davis RE, Stenberg PE, Levin J, Beckstead JH. Localization of megakaryocytes in normal mice and following administration of platelet antiserum, 5-fluorouracil, or radiostrontium: evidence for the site of platelet production. *Exp Hematol*. 1997;25(7):638–48.
153. Arivazhagan S, Kadiravan T, Basu D, Dutta TK. Validation of the megakaryocyte fragmentation theory of finger clubbing in patients with cardiopulmonary diseases. *Platelets* [Internet]. 2014;25(5):317–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2013.821605>
154. Vazquez-Abad D, Martinez-Lavin M. Macrothrombocytes in the peripheral circulation of patients with cardiogenic hypertrophic osteoarthropathy. *Clin Exp Rheumatol*. 1991;9(1):59–62.
155. Dickinson CJ. The aetiology of clubbing and hypertrophic osteoarthropathy. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 1993;23(6):330–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.1993.tb02032.x>
156. Valdivia-Mazeyra MF, Salas C, Nieves-Alonso JM, Martín-Fragueiro L, Bárcena C, Muñoz-Hernández P, et al. Increased number of pulmonary megakaryocytes in COVID-19 patients with diffuse alveolar damage: an autopsy study with clinical correlation and review of the literature. *Virchows Arch* [Internet]. 2021;478(3):487–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-020-02926-1>
157. Harrison MT, Short P, Williamson PA, Singanayagam A, Chalmers JD, Schembri S. Thrombocytosis is associated with increased short and long term mortality after exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a role for antiplatelet therapy? *Thorax* [Internet]. 2014;69(7):609–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-203996>
158. Levine RF, Shoff P, Han ZC, Eldor A. Circulating megakaryocytes and platelet production in the lungs. *Prog Clin Biol Res*. 1990;356:41–52.
159. Kumar V, Stewart JH IV. Platelet's plea to Immunologists: Please do not forget me. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2024;143(113599):113599. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2024.113599>
160. Livada AC, McGrath KE, Malloy MW, Li C, Ture SK, Kingsley PD, et al. Long-lived lung megakaryocytes contribute to platelet recovery in thrombocytopenia models. *J Clin Invest* [Internet]. 2024;134(22). Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118111>