

ANNA K. ORŁOWSKA¹, KATARZYNA BOCIAN¹, GRAŻYNA KORCZAK-KOWALSKA^{1,2}

Trypsyna a układ odpornościowy

Trypsin Affects Immunological Responses

¹ Zakład Immunologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

² Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Transplantologii AM w Warszawie

Streszczenie

Enzymy proteolityczne są często wykorzystywane w terapii ze względu na bezpieczeństwo i łatwość stosowania w leczeniu chorób trawiennych, żołądkowo-jelitowych, trzustki i chorób o podłożu autoimmunologicznym. Trypsyna jest podstawowym enzymem trawiennym w organizmie ludzkim i jednym ze składników doustnych preparatów enzymatycznych. Jest wydzielana przez komórki pęcherzykowe trzustki. Główną funkcją trypsyny jest hydroliza białek do poli- i oligopeptydów. Ostatnie badania wykazały, że trypsyna jest wytwarzana w niewielkich ilościach przez komórki Panetha, śródbłonek naczyń, leukocyty, hepatocyty i neurony, a w dużych przez niektóre komórki nowotworowe. Znaczenie trypsyny wydzielanej przez inne niż trzustkowe komórki nie jest w pełni poznane. Udowodniono, że podana doustnie jest absorbowana z jelita i wykrywana w surowicy krwi, a wraz z innymi proteazami, antyproteazami, składnikami dopełniacza i IgM dociera do miejsca zapalenia, do którego naciekają również komórki układu odpornościowego. Trypsyna jest zaangażowana w odporność wrodzoną, działając jako konwertaza prodefensyny. Podobieństwem do trypsyny charakteryzuje się granzym A, który poza wywoływaniem apoptozy w zmienionej komórce, może działać jako mitogen limfocytów B i usuwa niektóre białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania wykazały istotny wzrost stężenia inhibitorów proteaz po doustnym podaniu preparatów zawierających trypsynę oraz zmniejszenie ilości wolnych rodników uwalnianych podczas zapalenia. Trypsyna może również upośledzać proces aktywacji limfocytów T i B, adhezji i migracji przez usuwanie białek powierzchniowych biorących udział w tych procesach. Obserwuje się wpływ na funkcjonowanie limfocytów T w wyniku zmiany profilu wydzielanych cytokin, głównie hamowania wytwarzania cytokin Th1 związanych z występowaniem wielu chorób. Efekt ten może być związany z aktywacją przez trypsynę swoistego receptora PAR-2 oraz z innym nieznanym dotychczas mechanizmem (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 4, 791–798).

Słowa kluczowe: proteazy, trypsyna, absorpcja makromolekuł, terapia enzymatyczna.

Abstract

Trypsin is among the best characterised proteases. Pancreatic trypsin is involved in the activation of digestive proteinases and breakdown of ingested dietary proteins. Reports of nonpancreatic expression of trypsin highlight other nondigestive functions of this enzyme. Trypsin is also item of enzym therapy as it can be recovered from the blood after oral intake resulting in an increase of specific, hydrolitic activity in serum and multiplying its physiological action at the site of inflammation. Recently it has been showed that trypsin is able to block T cell activity by cleaving certain types of surface molecules involved in T and B cell activation as well as by influens on cytokine production. Trypsin can also enhance innate immune responses by acting as a prodefensin convertase in human small intestine and by affecting NK cells and macrophages. It has been suggested that trypsin executes signaling functions through interactions with proteinase-activated receptor-2 (PAR-2), which is expressed in various cells and participates in mitogenesis, apoptosis and cytokine production but other unknown mechanism is also possible (*Adv Clin Exp Med* 2005, 14, 4, 791–798).

Key words: proteases, trypsin, intestinal absorption, enzyme therapy.

Enzymy proteolityczne podawane doustnie są często stosowane w terapii wielu chorób, istnieją jednak kontrowersje dotyczące ich wykorzystania w leczeniu. Powodem tych wątpliwości jest, po-

wszechnie do niedawna, twierdzenie o niezdolności jelita człowieka dorosłego do absorpcji makromolekuł. Mimo to terapia enzymatyczna wzbudza zainteresowanie, szczególnie ze względu na istnie-

jące, pośrednie, dowody na absorpcję niezdegradowanych białek w warunkach fizjologicznych. Terapię tę charakteryzuje bezpieczeństwo i łatwość stosowania oraz skuteczność w leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym, zależnych od limfocytów T, takich jak: stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwory, zapalenie żył, w leczeniu ran u sportowców, uszkodzenia tkanek po radioterapii i innych [1–3].

Trypsyna jest podstawowym enzymem trawiennym w organizmie ludzkim i jednym z częściej stosowanych składników preparatów enzymatycznych. W tkankach ludzkich zidentyfikowano trzy izoformy trypsyny: kationową, anionową i mezotrypsynę. Geny kodujące formę kationową i anionową znajdują się na chromosomie 7 w obrębie obszaru kodującego TCR (*T cell receptor gene cluster*) [4, 5]. Gen kodujący mezotrypsynę znajduje się na chromosomie 9 [6]. Trypsyna pochodzenia trzustkowego, stanowiąca około 15% enzymów trawiennych wydzielanych do jelita, jest mieszaniną trzech izoform [4]. Jest wydzielana przez komórki pęcherzykowe trzustki w postaci nieaktywnego trypsynogenu, transportowana w tej formie do jelita, gdzie podlega aktywacji przez enterokinazę oraz samą trypsynę, która jest jednocześnie aktywatorem innych enzymów trawiennych. Główną funkcją jest hydroliza białek do polii- i oligopeptydów [6–8]. Ostatnie badania wykazały, że trypsyna jest wytwarzana w niewielkich ilościach również przez wiele innych komórek: komórki Panetha wyściełające dno krypt Lieberkuhna (forma anionowa i mezotrypsyna), śródbłonek naczyń, leukocyty, hepatocyty i neurony. Wysoką ekspresję trypsyny wykazują niektóre komórki i tkanki nowotworowe, np.: raka jajnika, żołądka, płuc, okrężnicy [9–15]. Ekspresja trypsyny w przebiegu nowotworu żołądka i jajnika u ludzi i w modelu mysim „nude” jest związana z niepożądanym rokowaniem [11–13]. Zostało opisane, że proteazy zdolne do degradowania białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) biorą udział w inwazji nowotworu i jego metastazie [11]. Proteazy odgrywają ważną rolę w migracji komórek, wpływając na interakcje komórek; proteoliza reguluje implantację trofoblastu, morfogenezę embrionu, angiogenezę i wiele innych procesów związanych z reakcjami między komórkami, ich aktywacją i apoptozą.

Mechanizm katalityczny

Trypsyna, podobnie jak trombina, chymotrypsyna i elastaza, należy do rodziny proteaz serynowych. Wszystkie enzymy zaliczane do tej grupy są endopeptydazami, co oznacza, że przecinają wią-

zania peptydowe wewnątrz cząsteczki białka. W miejscu aktywnym mają katalityczną triadę, która obejmuje reszty wysoko reaktywnej seryny, kwasu asparaginowego i histydy. Aminokwasy odgrywające najważniejszą rolę podczas reakcji katalitycznych znajdują się w kieszonce katalitycznej – zagłębieniu cząsteczki wysłanym resztami hydrofobowymi. Wielkość i kształt kieszonki oraz charakter chemiczny tworzących ją reszt aminokwasowych różnią się w poszczególnych proteazach i określają ich swoistość substratową. Trypsyna ma w swym miejscu wiązania substratu ujemnie naładowaną resztę kwasu asparaginowego, która oddziałuje z dodatnimi ładunkami na bocznych łańcuchach lizyny i argininy substratu. Trypsyna hydrolizuje wiązania po karboksylowej stronie lizyny lub argininy [6].

Wszystkie proteazy trzustkowe są syntetyzowane w postaci nieaktywnych prekursorów – zymogenów. Ma to na celu ochronę tkanek przed proteolizą. Aktywacja zymogenów polega na odcięciu N-końcowego fragmentu. W przypadku prekursora trypsyny zostaje odciętych sześć aminokwasów [6]. Reakcja konwersji trypsynogenu do trypsyny zachodzi z udziałem enterokinazy – hydrolazy wydzielanej przez dwunastnicę przy pH 5,2–6,0 oraz autokatalitycznie pod wpływem działania samej trypsyny przy pH 7,9. Polega na hydrolizie jedyne, występującego w sekwencji trypsyny, wiązania peptydowego między lizyną a izoleucyną [7].

Powstała w ten sposób niewielka ilość trypsyny aktywuje dalsze cząsteczki trypsynogenu oraz innych zymogenów: chymotrypsynogenu w chymotrypsynę, proelastazy w elastazę, prolipazy w lipazę, a zymogenów metaloproteaz w metaloproteazy. W wyniku tego procesu różne zymogeny zostają aktywowane w tym samym czasie, co umożliwia współdziałanie różnych enzymów proteolitycznych w trawieniu [6, 7].

Absorpcja makromolekuł z jelita

Problem absorpcji makromolekuł z jelita był przez wiele lat przyczyną licznych kontrowersji w środowisku naukowym. Mimo doniesień pochodzących z lat 70. XX w. o przepuszczalności jelita dla pewnych substancji, uważano ludzkie jelito za całkowicie nieprzepuszczalne dla dużych molekuł. Pojawiły się jednak informacje mogące sugerować, że w pewnych okolicznościach może zachodzić absorpcja makromolekuł, a wśród nich niezdegradowanych białek. Ten fenomen może być również związany z patofizjologią schorzeń jelita. Zwyczajowo uważa się, że podczas procesu tra-

wienia, białka ulegają pełnej hydrolizie pod wpływem działania proteaz jelita, do aminokwasów i w tej formie są wchłaniane. U człowieka ściana jelita jest przepuszczalna tylko u wcześniaków i noworodków parę dni po urodzeniu, wtedy tą drogą do krwi przedostają się przeciwciała matczyne. Po tym czasie następuje „zamknięcie” ściany jelita charakteryzujące się zastąpieniem płodowych komórek zdolnych do absorpcji przez komórki pozbawione zdolności transportu i ściśle do siebie przylegające. Ten obraz może oczywiście być zmieniony patologicznie. Rozważany był również mechanizm absorpcji makromolekuł wywołujących nietolerancję lub alergię pokarmową, jednak bez dostatecznych dowodów [16]. Pierwszym z poznanych mechanizmów, dzięki któremu duże cząsteczki mogą przedostawać się do krwi jest presorpcja, która polega na przenikaniu makromolekuł do krążenia przez przerwy w śródbłonku powstałe podczas migracji dojrzewających komórek do szczytu krypty Lieberkuhna oraz ruchów perystaltycznych powodujących „zgniataanie” komórek. Proces ten jest jednak bardzo nieefektywny, tylko jedna cząsteczka na milion przedostaje się tą drogą do krążenia. Mechanizm presorpcji, chociaż teoretycznie możliwy, nie może wyjaśniać przedostawania się cząsteczek leku do krążenia [10].

Drugim opisanym mechanizmem jest transport przez kępki Peyera. Kępki Peyera są nagromadzeniem grudek limfatycznych w nabłonku jelita cienkiego, tworzone przez enterocyty i komórki M. Absorpcja przez komórki M pozwala na szybkie wchłanianie małych ilości makromolekuł. Ponieważ tylko niewielka część powierzchni błony śluzowej jelita cienkiego jest pokryta komórkami M, transport ten jest ważną drogą dla białek działających jako antygeny dla układu odpornościowego, nie tłumaczy jednak wchłaniania dużych, biologicznie czynnych cząsteczek białek. Porównanie przepuszczalności tkanek w obrębie kępki Peyera i poza nią wykazało jedynie niewielkie różnice [10].

Innym mechanizmem absorpcji makromolekuł jest endo- lub transcytoza zależna od receptora. Receptorami są białka błonowe wykazujące powinowactwo do określonego substratu. W niektórych przypadkach endocytozy zależnej od receptora, cytozolowy odcinek receptora jest umiejscowiony w zagłębieniu nabłonka wysłanym klatryną. Po związaniu z ligandem, kompleks receptor–ligand zostaje wchłonięty i tworzy opłaszczony lub nieopłaszczony pęcherzyk, który może w pewnych warunkach ulegać fuzji z lizosomami. Losy receptora i ligandu zależą od roli, jaką pełnią:

1) jeśli receptor jest białkiem transportującym składniki odżywcze i metabolity, receptor wraca

do błony komórkowej, a substrat jest degradowany; do tej grupy należy opisany po raz pierwszy przez Goldsteina i Browna w 1974 r. receptor dla LDL oraz receptory dla α_2 -makroglobuliny i asialoglikoprotein,

2) receptor i ligand wracają do obiegu; dotyczy to transferyny i żelaza lub białek MHC,

3) jeśli ligand ma wywierać określony wpływ na komórkę (przekazywanie sygnału), to zarówno receptor, jak i ligand są degradowane. W tym przypadku szybka regeneracja receptora nie jest konieczna,

4) receptor i ligand nie podlegają ani degradacji, ani nie wracają do obiegu, ale są transportowane przez cytozol i wbudowywane w błonę z przeciwnej strony spolaryzowanej komórki – jest to transcytoza; najlepiej znanymi makromolekułami używanymi tej drogi transportu przez barierę śródbłonka jelit są immunoglobuliny, kompleks witamina B₁₂-IF, niektóre toksyny i wirusy [10].

Obecnie uważa się, że cząsteczki o masie > 1000 Da, poza pewnymi wyjątkami, mogą pokonać barierę nabłonka jelita. Niektóre z transportowanych cząsteczek wykazują ponadto aktywność biologiczną [3, 16]. Doustnie podana trypsyna i bromelaina w preparacie Phlogenzym są absorbowane w formie aktywnej, co skutkuje wzrostem swoistej, hydrolitycznej aktywności w surowicy [1, 16]. Wątpliwości budzi już nie sam proces absorpcji dużych cząsteczek z jelita jako taki, ale aspekt ilościowy. Żaden ze znanych i opisanych mechanizmów nie może tłumaczyć absorpcji dużych ilości makromolekuł, takich jak proteazy, których transport z jelita udowodniono metodami radiochemicznymi i enzymatycznymi oraz pośrednio przez ich skuteczność kliniczną. Badania nad poznaniem mechanizmu absorpcji proteaz napotykają na wiele problemów. W zależności od zastosowanej metody pomiaru obecności i aktywności enzymu uzyskuje się różne wartości. Powodem różnic jest przede wszystkim duże podobieństwo endo- i egzogennej proteazy, wykorzystywanie tego samego substratu przez endo- i egzogenną proteazę, a często również przez różne proteazy. Wpływ na aktywność enzymów ma temperatura, pH i obecność jonów, a także to, że enzymy mogą tworzyć agregaty dwóch lub trzech cząsteczek w zależności od ich poziomu w jelicie. Aktywność enzymatyczna w krwiobiegu (PSA) ponadto podlega regulacji przez składniki osocza, inhibitory proteaz i α_2 -makroglobulinę. Proces regulacji aktywności proteaz nie jest dotychczas dokładnie poznany [10].

Przeprowadzenie wiarygodnych badań nad modelem absorpcji makromolekuł z jelita umożliwiło zastosowanie linii ludzkich komórek Caco-2. Komórki linii Caco-2 różnicują się spontanicznie

w normalnych warunkach hodowli i są spolaryzowane, wykazują przez to morfologiczne i biochemiczne podobieństwo do normalnych enterocytów jelita cienkiego. Tworzą mikrokosmki i połączenia międzykomórkowe. Wykorzystanie tych komórek umożliwia badanie transportu leków i innych związków przez nabłonek jelita cienkiego w kontrolowanych warunkach hodowli. Zastosowanie fluoresceiny jako markera transportu i pomiaru TEER (*trans-epithelial electrical resistance*) pozwoliło na powstanie nowej hipotezy. Według niej absorpcja enzymów proteolitycznych przez nabłonek jelita cienkiego zachodzi za pomocą samowzmacniającej się dyfuzji międzykomórkowej przez miejscowo wydłużone połączenia międzykomórkowe. Model ten tłumaczy transport dużej liczby cząsteczek, a użycie fluoresceiny jako białka transportowanego o masie cząsteczkowej powyżej 600 kDa dowodzi, że wielkość cząsteczki nie ma w nim znaczenia [8, 10].

Obecność proteaz we krwi

Trypsyna jest stałym składnikiem surowicy krwi, gdzie jej stężenie fizjologiczne wynosi około 300 µg/l [17]. Może ona przez krótki czas krążyć w formie aktywnej i wolnej do chwili, gdy albo ulegnie autodestrukcji, albo zwiąże się ze swoim istym inhibitorem lub białkiem transportującym, antyproteazą: α_2 -makroglobuliną [10, 17, 18]. α_2 -makroglobulina charakteryzuje się zdolnością do wiązania wielu fizjologicznie istotnych cząsteczek, cytokin, wszystkich znanych endopeptydaz, miofenonów, takich jak: konkanawalina A, fitohemaglutynina i lipopolisacharyd, a także histonów i licznych jonów, np.: cynku czy niklu. Może przez to wpływać na procesy immunologiczne zależne od tych cząsteczek [10].

Biologicznie aktywne lub częściowo aktywne proteazy podane doustnie są wykrywane w surowicy po 3–5 godzinach [16]. W warunkach zapalenia dochodzi do wielu zmian w naczyniach krwionośnych: rozszerzenia naczyń włosowatych, zwolnienia przepływu krwi i zwiększenia przenikalności ścian naczyń dla białek, komórek i płynów. Trypsyna wraz z innymi proteazami i antyproteazami surowiczymi, składnikami dopełniacza i IgM dociera do miejsca zapalenia, do którego naciekają również komórki układu odpornościowego [17].

Wpływ trypsyny na reakcje immunologiczne

Działanie trypsyny w przewodzie pokarmowym nie ogranicza się jedynie do jej czynności trawiennych. Jak wykazano, jest ona również wy-

dzielana przez komórki Panetha i odgrywa istotną rolę w proteolitycznej aktywacji α -defensyny 5 (HD5) [9, 14]. Podobnie jak inne defensyny, HD5 jest peptydowym antybiotykiem tkankowym wykazującym aktywność przeciwko bakteriom, mykobakteriom, grzybom oraz wirusom otoczkowym [19]. Komórki Panetha gromadzą w swoich ziarnistościach wydzielniczych, oprócz lizozymu i fosfolipazy A₂, również prodefensynę 5. Podczas aktywacji cholinergiczej lub stymulacji bakteryjnej następuje degranulacja i uwolnienie zawartości ziarnistości do światła jelita. W jelicie cienkim trypsyna odcina N-końcowy fragment prodefensyny, prowadząc do powstania w pełni aktywnej formy α -defensyny 5. Trypsyna, działając jako konwertaza prodefensyny, jest więc zaangażowana we wrodzoną odporność związaną z jelicem cienkim [9, 14].

Rola proteaz w odporności wrodzonej objawia się również jej działaniem w obszarze objętym ostrym stanem zapalnym. Szczególnym rodzajem proteaz, pełniących rolę w odpowiedzi immunologicznej, są granzymy [20]. Granzymy, rodzina proteaz serynowych, ulegają ekspresji w cytotoksycznych limfocytach T oraz komórkach NK i składają się na odporność przeciwwirusową skierowaną przeciw własnym zmienionym komórkom. Rodzina granzymów jest dobrze scharakteryzowana u ludzi i gryzoni. Należą do niej trzy podrodziny charakteryzujące się swoistością substratów. Pierwszą z podrodzin tworzą granzymy wykazujące aktywność podobną do chymotrypsyny, drugą – do trypsyny, trzecia z podrodzin rozcina sekwencję białkową po metioninie. Po rozpoznaniu komórki docelowej, zainfekowanej lub zmutowanej, limfocyt cytotoksyczny lub komórka NK uwalnia granzymy. Przedostają się one do komórki docelowej za pomocą endocytozy i wywołują w niej apoptozę. Najsilniejszym czynnikiem proapoptotycznym jest granzym B. Inne granzymy mogą spełniać inne, niezwiązane z apoptozą funkcje. Granzym A, charakteryzujący się podobieństwem do trypsyny, może być związany z regulacją proliferacji limfocytów B. Może on w czasie nieobecności antygeny działać jako mitogen dla limfocytów B, może również usuwać białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), ułatwiając przez to migrację limfocytów Tc i NK przez śródbłonek naczyń [20]. Granzymy wzmagają również uwalnianie cytokin, wpływając bezpośrednio na proces zapalny. Wykazano, że granzym A rozcina receptor trombinowy po sekwencji Leu-Asp-Pro-Arg i wyzwala przez to uwalnianie IL-6 i IL-8 przez monocyty. Poznanie roli granzymów A i B w infekcji wirusowej umożliwiło doświadczenie z wykorzystaniem myszy z uszkodzonymi genami kodującymi te granzymy. Wykazano, że myszy te były wrażliwe na uszkadzający komórki wirus

ectromelia, zdolne zaś do normalnej odpowiedzi na nieuszkodzający komórki wirus LCMV (*lymphocytic choriomengitis virus*) i na zakażenie *Listeria monocytogenes* [20].

Badania wykazały, że podczas ostrego zapalenia enzymy proteolityczne i wolne rodniki tlenowe uwalniane przez komórki osiągają względnie wysoki poziom. Powodują one liczne uszkodzenia nie tylko tkanki objętej procesem zapalnym, ale i tkanek sąsiadujących z nią. Ważną rolę ochronną pełnią wówczas inhibitory proteaz, takie jak α_1 -antytrypsyna i α_2 -makroglobulina należące do grupy białek ostrej fazy (APP), których podstawową biologiczną funkcją jest wiązanie plazminy i zahamowanie proteolizy. Badania wykazały istotny wzrost poziomu inhibitorów proteaz po doustnym podaniu preparatu zawierającego trypsynę oraz zmniejszenie ilości wolnych rodników uwalnianych podczas stanu zapalnego [21]. Tym samym przyczynia się do zmniejszenia uszkodzeń tkanki i przyspiesza gojenie ran. Badania pokazały ponadto, że mieszanina enzymów trypsyny i chymotrypsyny pomaga minimalizować szkodliwe, proteolityczne działanie katepsyny D i elastazy, a także przez szybkie zahamowanie rozwijającej się odpowiedzi zapalnej zmniejszać obrzęk [21]. Stwierdzono również bezpośredni wpływ proteaz na komórki zaangażowane w odporność wrodzoną, zwłaszcza makrofagi i komórki NK. Wykazano, że bromelaina wzmacnia indukowane przez IFN- γ wytwarzanie tlenu azotu i TNF- α przez makrofagi oraz wytwarzanie IFN- γ przez aktywowane IL-2 i IL-12 komórki NK [22]. Doświadczenia te dowodzą, że proteazy, w tym przypadku bromelaina, przez wzmocnienie funkcji efektorowych makrofagów i komórek NK, wzmacnia wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Trypsyna może upośledzać aktywację i migrację komórek w obszarze objętym procesem zapalnym przez usuwanie białek powierzchniowych biorących udział w adhezji i migracji leukocytów. Może to być korzystne w przypadku nadmiernej odpowiedzi immunologicznej, gdy istnieje potrzeba ograniczenia napływu komórek do miejsca zapalenia.

W zależności od modelu doświadczalnego: zwierzęcia, od którego pobrano komórki, warunków hodowli, użytego przeciwciała monoklonalnego, opisano wiele cząsteczek powierzchniowych usuwanych przez trypsynę. Opisano obniżenie ekspresji CD3 na limfocytach T, CD44 na limfocytach T i B, odgrywającej rolę w adhezji limfocytów do śródbłonna, CD58 (LFA-3) na limfocytach B, CD80 (B7-1) na limfocytach B, CD86 (B7-2) na niedojrzałych komórkach dendrytycznych, zaś wzrost ekspresji CD11a (LFA-1) na powierzchni limfocytu T [3, 17, 23]. Obserwowano obniżenie odsetka limfocytów CD4-dodatnich

w populacji mysich komórek [1]. Niezależnie jednak od uzyskanych wyników stwierdzono zmiany w ekspresji białek zaangażowanych w adhezję czy przekazywanie sygnału aktywującego limfocyty T i B [24]. O ile zmniejszenie ekspresji danej cząsteczki na powierzchni można wytłumaczyć działaniem proteolitycznym, o tyle wzrost ekspresji niektórych cząsteczek może opierać się na innym, nieznanym mechanizmie. Zaskakujące jest również, że spośród zbadanych cząsteczek tak niewiele wykazuje wrażliwość na działanie trypsyny. Mimo że większość białek ma miejsce cięcia dla trypsyny, jest ono dla niej niedostępne. W przewodzie pokarmowym, gdzie zakres działania trypsyny jest bardzo szeroki, ma ona zdolność trawienia większości białek. W niskim pH przewodu pokarmowego białka ulegają denaturacji, odsłaniając miejsca cięcia enzymu. We krwi natomiast białka występują w formie natywnej, a miejsca cięcia trypsyny są przed nią „schowane” [17]. Cząsteczki wrażliwe na działanie trypsyny biorą udział w regulacji odpowiedzi komórkowej. Selektywne cięcie cząsteczek powierzchniowych, takich jak: CD4, CD44, B7-1 i B7-2 powoduje podwyższenie progu aktywacyjnego komórek, na którym się znajdują [17, 23], a także zwiększa prawdopodobieństwo negatywnych regulatorów aktywacji limfocytów T (CTLA-4) na związanie cząsteczki kostymulacyjnej (CD28). Zwiększona ekspresja cząsteczek powierzchniowych zaangażowanych w proces aktywacji jest wywołana głównie przez miejscowe uwolnienie IFN- γ i towarzyszy procesowi zapalnemu. Bez zwiększenia ekspresji cząsteczek nie dochodzi do wielu patologii związanych z nadmierną aktywacją limfocytów T. Usunięcie przez trypsynę niektórych cząsteczek powierzchniowych może miejscowo osłabiać aktywację limfocytów T i działać jako fizjologiczny regulator odpowiedzi zapalnej. Podobnie jest możliwe osiągnięcie efektu terapeutycznego przez podwyższenie progu aktywacji limfocytów T i wyciszenie reakcji limfocytów T podczas procesu patologicznego. Nie będzie to typowy efekt immunosupresyjny, a jedynie immunomodulacyjny [17]. Udowodniono, że bromelaina, drugi składnik preparatów enzymatycznych, również w sposób wybiórczy usuwa cząsteczkę CD44 z powierzchni limfocytów T i wzmacnia w ten sposób działanie trypsyny [1, 3].

Proteazy wpływają na funkcjonowanie limfocytów T również przez zmianę profilu wytwarzanych cytokin [1, 3, 23]. Limfocyty Th różnicują się w subpopulacje Th1, Th2 i Th3, różniące się profilem wydzielanych cytokin. Limfocyty Th1 wytwarzają głównie IL-2 i IFN- γ , wspomagające odpowiedź komórkową, Th2 wytwarzają duże ilości IL-4 i IL-5, będące czynnikami wzrostu i różnico-

wania limfocytów B i wspomagają głównie odpowiedź humoralną. Limfocyty Th3 wytwarzają głównie TGF- β [25, 26]. Wpływ proteaz na profil wytwarzanych cytokin był badany na modelu mysim i na linii limfocytów T. Badania wykazały, że proteazy, w tym trypsyna, obniżają poziom cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th1, których nadmierna aktywacja jest związana z wystąpieniem wielu chorób o podłożu immunologicznym, takich jak stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca typu I, nieswoiste zapalenie jelit [3]. Stwierdzono zahamowanie wytwarzania IL-2 po hodowli z bromelainą w różnych stężeniach przez splenocyty mysie [23] oraz całkowite zahamowanie uwalniania IFN- γ przez autoreaktywną linię limfocytów T w odpowiedzi na autoantygen pod wpływem mieszaniny trypsyny i bromelainy. Nie obserwowano zaś wpływu mieszaniny proteaz na wytwarzanie IFN- γ w odpowiedzi na niezależną od receptora powierzchniowego aktywację kinaz ERK-2 i p21^{ras} estrami forbolu i jonomycyną [3, 23, 27]. Może to świadczyć o selektywnym działaniu proteaz na reaktywność na autoantygeny i może mieć duże znaczenie w leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym. Obserwowano ponadto zwiększenie wytwarzania IL-4 i zahamowanie uwalniania IL-10 pod wpływem mieszaniny proteaz po stymulacji PMA/J, podczas gdy ich uwalnianie nie było zmienione w odpowiedzi na autoantygen u pacjentów z cukrzycą typu I, a więc w przebiegu przewlekłego zapalenia [3]. Opisano obniżenie stężenia IL-6 zarówno w surowicy, jak i w moczu u pacjentów z cukrzycą leczonych preparatami enzymatycznymi. U tych pacjentów poziom IL-6 jest zwiększony w związku z chorobą [28]. Opisano również, że bromelaina może zwiększać zależne od IFN- γ wytwarzanie TNF- α , IL-1 β i IL-6 przez ludzkie komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, a także zmniejszać wytwarzanie IL-2, IL-4 i IFN- γ [23].

Badania wykazały, że wpływ na aktywację limfocytów i profil wytwarzanych cytokin może być związany z aktywacją przez trypsynę swoistego receptora [29, 30]. Udowodniono, że trypsyna przez aktywację receptora PAR-2 powoduje zmniejszenie ekspresji IL-2, IL-12, IFN- γ i TNF- α [31]. Receptory aktywowane przez proteazy (PAR) są niedawno opisaną grupą receptorów z rodzaju serpentynowych, siedmiokrotnie przechodzących przez błonę, związanych z białkiem G. Receptory PAR mają rzadko spotykany mechanizm aktywacji. Ich aktywacja zachodzi przez proteolityczne odcięcie zewnątrzkomórkowego N-końcowego fragmentu. Powstaje wówczas nowy N-koniec, którego sześć pierwszych aminokwasów stanowi swoisty ligand łączący się z zewnątrzkomórkową, drugą pętlą receptora. Opisano cztery rodzaje receptora PAR:

PAR-1, PAR-2, PAR-3 i PAR-4. Fizjologicznym aktywatorem PAR-1 i PAR-3, występujących głównie na płytkach krwi, śródbłónka naczyń i leukocytach, jest trombina. PAR-2, występujący na wielu komórkach nabłonkowych i śródbłonkowych, limfocytach T, komórkach mięśni gładkich i liniach komórek nowotworowych, jest aktywowany przez rodzinę trypsynopodobnych proteaz serynowych, takich jak: trypsyna, tryptaza mastocytów, neutrofilowa proteaza 3, czynniki krzepnięcia VIIa, Xa. PAR-4 jest aktywowany zarówno przez trypsynę, jak i trombinę. Jego wysoką ekspresję wykazują komórki płuc, tarczycy, jąder i jelita cienkiego [11]. W wewnątrzkomórkowym procesie przekazywania sygnału z PAR biorą udział zarówno szlaki związane z metabolizmem fosfatydyloinozytolu, jak i szlak związany z białkami o aktywności GTP-az i kaskady kinaz aktywowanych przez mitogen. Wobec tego, że receptor PAR-2 i trypsyna występują w tych samych tkankach, uważa się, że trypsyna jest naturalnym aktywatorem PAR-2 [11, 32–37]. Udowodniono, że z aktywacją PAR-2 jest związana kaskada Ras/Raf-1/MEK/ERK1 i ERK2, decydująca o mitogenezie, apoptozie i wytwarzaniu cytokin [27]. Rola biologiczna PAR, mimo rozpowszechnienia tego receptora w tkankach, nie jest do końca poznana. Wiadomo, że aktywacja PAR-2 może wywoływać obrzęk, przyspieszać toczenie leukocytów i wzmacniać adhezję komórek do śródbłónka naczyń oraz infiltrację tkanek przez neutrofile [11]. Uważa się, że adhezja komórek do fibronektyny i witronektyny jest spowodowana przez zależną od PAR-2 aktywację kinaz FAK (*focal adhesion kinases*) [11], szybka zaś indukcja tego receptora w naczyniach w wyniku uszkodzenia ściany naczynia wskazuje na jego rolę w przewlekłych procesach zapalnych [33].

Komórki układu immunologicznego są aktywną częścią obrony organizmu przed infekcjami, kiedy jednak są aktywowane w sposób nieodpowiedni, mogą stać się przyczyną niekontrolowanego, miejscowego lub systemowego stanu zapalnego. Nadreaktywne limfocyty powodują często chroniczne i postępujące choroby, takie jak *glomerulonephritis*, stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów. W tych chorobach szczególnie istotna jest możliwość modulowania aktywacji limfocytów T. Takiej możliwości dostarcza terapia enzymatyczna wykorzystująca trypsynę. Badania *in vitro* dowodzą usuwania pod wpływem trypsyny niektórych cząsteczek powierzchniowych, zaangażowanych w aktywację i adhezję. Generowanie rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych jest jej dodatkową funkcją immunomodulacyjną. Trypsyna wywiera zróżnicowany wpływ na wytwarzanie cytokin, zmniejszając wytwarzanie cy-

tokin Th1 i podwyższając poziom niektórych cytokin Th2. Wydaje się, że mechanizm działania trypsyny zmienia się w różnych typach leukocytów, działając inaczej na limfocyty T i B, inaczej na komórki NK. Plejotropowe rezultaty działania tego

taniego i dostępnego enzymu wymagają jeszcze dokładniejszych badań, a poznanie mechanizmów działania trypsyny pozwoli na powszechne zastosowanie jej jako leku.

Piśmiennictwo

- [1] **Manhart N, Acomeah R, Bergmeister H, Spittler A, Ploner M, Roth E:** Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4+ cells and the interferon- γ response in Peyer's patches and spleen in endotoxemic balb/c mice. *Cell Immunol* 2002, 215, 113–119.
- [2] **Pecher O:** Oral Enzymes. MUCOS Pharma GmbH & Co. Berlin 1996.
- [3] **Roep BO, van den Engel NK, van Halteren AG, Duinkerken G, Martin S:** Modulation of autoimmunity to beta-cell antigens by proteases. *Diabetologia* 2002, 45, 686–692.
- [4] **Chen JM, Ferec C:** Genes, cloned cDNAs and proteins of human trypsinogens and pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutation. *Pancreas* 2000, 21, 57–62.
- [5] **Rowen L, Koop BF, Hood L:** The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 1996, 272, 1755–1762.
- [6] **Stryer L:** Biochemia. PWN, Warszawa 1999.
- [7] **Barett AJ, Rawlings ND, Woessner JF:** Handbook of proteolytic enzymes. Acad Press 2000.
- [8] **Bock U, Kolac C:** Transport of proteolytic enzymes across Caco-2 Cell Monolayers. *Pharm Res* 1998, 15, 1393–1400.
- [9] **Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Bevins CH:** Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nat Immun* 2002, 3, 583–590.
- [10] **Kolac C, Streichhan P, Lehr CM:** Oral bioavailability of proteolytic enzymes. *Eur J Pharm Biopharm* 1996, 42, 222–232.
- [11] **Miyata S, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyazaki K:** Trypsin stimulates Integrin $\alpha_5\beta_1$ -dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of Proteinase-activated Receptor-2. *J Biol Chem* 2000, 275, 4592–4598.
- [12] **Yamamoto H, Iku S, Adachi Y, Imsumran A, Taniguchi H, Noshio K, Min Y, Horiuchi S, Yoshida M, Itoh F, Imai K:** Association of trypsin expression with tumour progression and matrilysin expression in human colorectal cancer. *J Pathol* 2003, 199, 176–184.
- [13] **Yamamoto H, Iku S, Itoh F, Tang X, Hosokawa M, Imai K:** Association of trypsin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001, 91, 1324–1331.
- [14] **Zasloff M:** Trypsin for the defence. *Nat Immun* 2002, 3, 508–510.
- [15] **Koshikawa N, Hasegawa S, Nagashima Y, Mitsuhashi K, Tsubota Y, Miyata S, Miyagi Y, Yasumitsu H, Miyazaki K:** Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leucocytes and neurons in human and mouse. *Am J Pathol* 1998, 153, 937–944.
- [16] **Castell JV, Friedrich G, Kuhn C-S, Poppe GE:** Intestinal absorption of undegraded proteins in men. *Am J Physiol* 1997, 273, G139–G146.
- [17] **Lehmann PV:** Immunomodulation by proteolytic enzymes. *Nephrol Dial Transplant* 1996, 11, 953–955.
- [18] **Hale LP, Haynes BF:** Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. *J Immunol* 1992, 149, 3809–3816.
- [19] **Moskalewski S, Sawicki W:** Histologia z elementami biologii molekularnej. Wydawnictwo WAM, Warszawa 2000.
- [20] **Trapani NK:** Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* 2001, 2, 3014.1–3014.7.
- [21] **RaviKumar T, Ramakrishnan M, Jayaraman V, Babu M:** Effect of trypsin-chymotrypsin (Chymoral forte DS) preparation on the modulation of cytokine levels in burn patients. *Burns* 2001, 27, 709–716.
- [22] **Engwerda Ch, Andrew D, Murphy M, Maynott TL:** Bromelain Activates Murine Macrophages and Natural Killer Cells in Vitro. *Cell Immunol* 2001, 210, 5–10.
- [23] **Engwerda Ch, Andrew D, Landhams A, Maynott TL:** Bromelain Modulates T Cell and B Cell Immune Responses *in vitro* and *in vivo*. *Cell Immunol* 2001, 210, 66–75.
- [24] **Biro A, Henrics Z, Feller E, Szilagyi L, Barad Z, Gergely J, Graf L, Sarmay G:** Characterization of a trypsin-like serine proteases of activated B cells mediating the cleavage of surface proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1624, 60–69.
- [25] **Drela N:** Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej. Zastosowanie i problemy. *Post Biol Komórki* 2001, 28, 129–146.
- [26] **Prussin C, Metcalfe D:** Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995, 188, 117–128.
- [27] **Mynott TL, Landhams A, Scarmato P, Engwerda ChR:** Bromelain, from pineapple stems, proteolytically blocks activation of Extracellular Regulated Kinase-2 in T cells. *J Immunol* 1999, 163, 2568–2575.
- [28] **Pączek L, Kropiewnicka EH, Bartłomiejczyk I, Gradowska L, Heiland A, Wood G:** Systemic Proteolytic Enzyme Treatment diminishes Urinary Interleukin 6 in Diabetic Patients. *Nephron* 2000, 84, 194–195.

- [29] **Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW:** Proteinase-activated receptors: novel mechanism of signalling by serine proteases. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998, 274, C1429–C1452.
- [30] **Macfarlane SR, Seater MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin K:** Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001, 53, 245–282.
- [31] **Fiorucci S, Menzarelli A, Palazzetti B, Distrutti E, Vergnolle N, Hollenberg MD, Wallace JL, Morelli A, Cirino G:** Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *PNAS* 2001, 98, 13936–13941.
- [32] **Coughlin SR, Camerer E:** Participation in inflammation. *J Clin Invest* 2003, 111, 25–27.
- [33] **Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso E, Dunning L, Plevin R, Meek S:** Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis. *J Clin Invest* 2003, 111, 35–41.
- [34] **Kawabata A, Kinoshita M, Nishikawa H, Kuroda R, Nishida M, Araki H:** The proteinase-activated receptor-2 agonist induces gastric mucus secretion and mucosal cytoprotection. *J Clin Invest* 2001, 107, 1443–1450.
- [35] **Hansen KK, Saifeddine M, Hollenberg MD:** Tethered ligand-derived peptides of proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) activate PAR-1 and PAR-2 in Jurkat T cells. *Immunology* 2004, 112, 183–190.
- [36] **Kanke T, Macfarlane SR, Seatter MJ, Davenport E, Paul A, McKenzie RC, Plevin R:** Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory κ B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem* 2001, 276, 31657–31666.
- [37] **Nguyen TD, Moody MW, Steinhoff M, Okolo Ch, Koh D-S, Bunnett NW:** Trypsin activates pancreatic duct epithelial cell ion channels through proteinase activated receptor-2. *J Clin Invest* 1999, 103, 261–269.

Adres do korespondencji:

Anna Katarzyna Orłowska
Zakład Immunologii, Instytut Zoologii UW
ul. Miecznikowa 1
02-096 Warszawa
e-mail: aorłowska@biol.uw.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 19.11.2004 r.

Po recenzji: 10.01.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 10.01.2005 r.

Received: 19.11.2004

Revised: 10.01.2005

Accepted: 10.01.2005