

Marcin STOBIECKI
Wojciech DYGA

Zakład Alergologii Klinicznej
i Środowiskowej Katedry Toksykologii
Klinicznej i Środowiskowej
Collegium Medium
Uniwersytet Jagielloński
Kierownik:
Prof. dr hab. med.
Krystyna Obtulowicz

Słowa kluczowe:

- anafilaksja
- tryptaza
- komórka tuczna

Key words:

- anaphylaxis
- tryptase
- mast cell

Tryptaza w diagnostyce chorób alergicznych

W diagnostyce reakcji anafilaktycznych i anafilaktoidalnych z udziałem komórki tucznej, oznaczanie stężenia tryptazy w surowicy krwi znajduje coraz szersze zastosowanie. Ugruntowaną pozycję diagnostyczną mają oznaczenia poziomu tryptazy w mastocytozie, w popłuczynach nosowych i oskrzelowych chorych poddawanych swoistym prowokacjom alergenowym oraz w prognozowaniu reakcji anafilaktycznych chorych odczulanych na jad owadów błonkoskrzydłych. Interpretacja wyników badań w innych niż anafilaksja schorzeniach jest trudna, z uwagi na niejasną rolę komórki tucznej w ich przebiegu.

Tryptase in diagnosing of allergic diseases

The release of tryptase from the secretory granules is a characteristic feature of mast cell degranulation and its usefulness for diagnosing of potential allergic reactions. While its biological function has not been fully clarified, mast cell tryptase has an important role in inflammation and serves as a marker of mast cell activation. Serum tryptase concentration is increased in anaphylaxis and in systemic mastocytosis. But they may also occur as a result of direct mast cell activation without any allergy reaction. Other allergic conditions like specific allergen challenge show the increasing levels of tryptase in BAL and in nasal lavage fluid. Increased tryptase levels among patients who are desensitized for venom allergy is highly suggestive of high risk of complication like severe anaphylactic reaction. Serum tryptase measurements can be used to distinguish mast cell-dependent reactions from other systemic disorders with similar clinical manifestations.

Wstęp

W roku 1960 odkryto właściwość ziarnistości komórek tucznych określoną jako aktywność trypsynopodobną (*trypsin-like activity*) a wyodrębniony enzym nazwany został tryptazą [1]. Do chwili obecnej bardzo mało wiadomo o prawdziwej biologicznej roli tryptazy w organizmie, równocześnie nie do końca poznana jest jej funkcja w schorzeniach z udziałem komórki tucznej. Wynika to z faktu, że nadal nie odkryto fizjologicznego substratu, który wchodziłby w reakcje z tryptazą a jedynie w warunkach in vitro udowodniono taką zdolność dla niektórych białek i protei. W diagnostyce tryptaza znalazła zastosowanie jako enzym monitorujący aktywność komórki tucznej.

Komórka tuczna

Komórka tuczna (mastocyt, *mast cell MC*) pochodzi z multipotencjalnych komórek szpiku kostnego CD34+. Pojawia się we krwi obwodowej a następnie osadza się w tkankach takich jak skóra, płuca, błona śluzowa i podśluzowa jelit. Tam odbywa się jej dojrzewanie pod wpływem ogólnych i lokalnych czynników wzrostowych takich jak i czynnik komórek pnia (SCT), czynnik wzrostu komórek tucznych (MCGF) czy c-kit ligandu. Wyróżniamy dwa typy komórek tucznych: MCt które w ziarnistościach zawierają jedynie tryptazę (zlokalizowane w pęcherzykach płucnych i śluzówce jelit), oraz MCtc w ziarnistościach których poza tryptazą znajduje się chymaza (zlokalizowane w skórze właściwej, warstwie podśluzowej jelit i naczyniach krwionośnych) [2].

Mastocyt typowo identyfikowany jest z reakcją nadwrażliwo-

ści typu natychmiastowego, czyli z reakcją typu I. według podziału *Gella* i *Coombsa*[3] w której odgrywa kluczową rolę. Tryptaza jest jednym z wielu mediatorów uwalnianych z komórek tucznych, biorących udział w reakcjach typu natychmiastowego (tabela I) [4,5].

Tabela I

Rodzaj mediatorów uwalnianych z komórek tucznych i bazofiliów [6,7].

Type of mediators released from mast cells and basophiles.

Rodzaje mediatorów:	Zawartość:
• Preformowane (zgromadzone w ziarnistościach)	<ul style="list-style-type: none"> • histamina • czynniki chemotaktyczne dla eozynofiliów i neutrofilów (ECF, NCF) • cytokiny: TNFα, IL-6, endotelina-1 • enzymy: arylosulfataza A, egzoglikozydazy, kininigenaza
• Syntetyzowane de novo podczas procesu degranulacji	<ul style="list-style-type: none"> • nadtlenki i rodniki tlenowe • leukotrieny (C4, D4, E4) • PGD2 • bradykinina • adenozyzna • PAF PGFA (prostaglandin-generating factor of anaphylaxis)
• Ściśle związane z ziarnistościami	<ul style="list-style-type: none"> • heparyna • chondroityna enzymy: tryptaza, chymaza, catepsyna G, karboksypeptydaza, peroksydaza, arylosulfataza B, dysmutaza nadtlenkowa
• Cytokiny wytwarzane po aktywacji	<ul style="list-style-type: none"> • interleukiny: 1, 2, 3, 4, 5, 6, GM-CSF, TNFα, endotelina-1 • MCF (monocyte chemotactic and activating factor) • MIP (macrophage inflammatory protein 1α, 1β)

Adres do korespondencji:

Dr Marcin Stobiecki

Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej
Katedry Toksykologii Klinicznej i Środowiskowej CM UJ
31-531 Kraków, ul. Śniadeckich 10

Tel.: 012 424 88 90

e-mail: mmobtulowicz@cyf-kr.edu.pl

W literaturze sugerowany jest również udział komórki tłuszcznej w procesach zapalnych w przebiegu innych schorzeń. Zwraca się uwagę na rolę jaką odgrywa komórka tłuszczna w chorobach autoimmunologicznych takich jak: reumatoidalne zapalenia stawów, twardzina, pemfigoid. Obserwacje te oparte są w większości przypadków na zwierzęcych modelach eksperymentalnych chorób autoimmunologicznych. Porównują one przebieg choroby u myszy zdrowych i myszy z mutacją W/W czynnika wzrostowego komórek pnia, która to mutacja zaburza dojrzewanie komórek tłuszcznych. [8]. Poza stwierdzeniem obecności komórki tłuszcznej w wyżej wymienionych stanach zapalnych podkreślają się, że profil uwalnianych substancji aktywnych z ziarnistości komórek tłuszcznych może być różny w różnych schorzeniach [9].

Degranulacja komórki tłuszcznej i związane z nią uwolnienie mediatorów może być wywołana najróżniejszymi mechanizmami. Najlepiej poznany to mostkowanie specyficznym antygenem (alergenem) IgE ufkowanego w błonie mastocyta dzięki receptorowi o wysokim powinowactwie – FcεRI [10]. Możliwe, lecz słabiej przebadane są inne mechanizmy degranulacji komórki tłuszcznej. Wymienia się następujące substancje i mechanizmy prowadzące do degranulacji komórki tłuszcznej na drodze IgE niezależnej: anafilotoksyny C3a, C5a, neuropeptydy np. substancja P, pobudzenie receptorów *Toll-like* [11].

Substancje preformowane, oraz eikosanoidy są zasadniczymi czynnikami wpływającymi na rozwój fazy wczesnej reakcji natychmiastowej. Wykazują działanie farmakologiczne na naczynia krwionośne dróg oddechowych i drogi oddechowe, dające w efekcie objawy kliniczne kataru siennego, astmy oskrzelowej, pokrzywki, wyprysku atopowego, anafilaksji.

Rola cytokin wiąże się natomiast z zapoczątkowaniem fazy późnej reakcji typu natychmiastowego (LAR: Late Allergic Response) lub przewlekłej fazy zapalenia alergicznego (chemotaksja, nacieki i gromadzenie komórek zapalnych). Klinicznie faza późna reakcji natychmiastowej objawia się analogicznie jak objawy wczesne. Może rozpoczynać się między 2 - 4 godziną od reakcji natychmiastowej, ma swoje maksimum po ok. 8 - 12 godzinach i trwa do 24 godzin.

Tryptaza

Tryptaza jest enzymem specyficznym dla ziarnistości komórek tłuszcznych. W organizmie ludzkim występuje ona pod postaciami: α-tryptaza, β-tryptaza, γ-tryptaza oraz δ-tryptazy, a każda z nich posiada podtypy. Krótką charakterystykę poszczególnych typów podano w tabeli II.

Tabela II
Typy ludzkiej tryptazy [12].
Types of human tryptase.

Typ	Podtyp	Cechy charakterystyczne
α-tryptaza	α I α II	Posiada małą aktywność biologiczną. Jest obecna w niskich stężeniach w surowicy krwi nawet przy braku degranulacji komórki tłuszcznej.
β-tryptaza	β 1 β 2 β 3	Jest główną formą przechowywaną w ziarnistościach komórek tłuszcznych. Uwalniana w trakcie ciężkich zapaleń takich jak wstrząs anafilaktyczny. Nieobecna w surowicy krwi.
γ-tryptaza	γ I γ II	Jest białkiem osadzonym w błonie komórkowej zarówno ziarnistości jak i błonie zewnętrznej komórki tłuszcznej, funkcja nieznaną
δ-tryptaza	δ I δ II	Postać o znamienne krótszym łańcuchu, inne powinowactwo do peptydów

Przeprowadzone w ostatnich latach badania umożliwiły poznanie dokładnej budowy tych białek obejmującej strukturę pierwszo-, drugo- i trzecio-rzędowe. Precyzyjnie zidentyfikowano centra aktywne oraz miejsca wiązania tryptazy z heparyną, kluczowe dla aktywności tego enzymu.

Charakterystyczna dla tryptazy oporność na działanie inhibitorów proteaz wynika z unikatowej zdolności tego białka do tworzenia cząstek o budowie tetrameru z centrum aktywnym zwróconym do wnętrza i niedostępnym dla białek o właściwościach in-

hibujących [13]. Regulacja aktywności tryptazy z uwagi na ten specyficzny mechanizm ochronny nie podlega zależności proteaza-inhibitor proteazy. Jedyny sugerowany mechanizm regulacyjny, oparty na obserwacjach *in vitro*, to zależna od pH zdolność tryptazy do wiązania się z cząsteczką heparyny która ułatwia tworzenie aktywnych tetramerów. W obojętnym pH zdolność ta zanika, a tetrametry rozpadają się, pH kwaśne sprzyja budowie tetrameru [14]. Jak już wspomniano nie zidentyfikowano fizjologicznego substratu dla tryptazy. Wiele białek takich jak: fibrynogen prekalikreina, neuropeptydy – VIP, C3, II-6, HDL stanowią jej potencjalny substrat. Ponieważ dowody takie znaleziono jedynie w badaniach *in vitro* [14] a wynikająca z tego biologiczna rola tryptazy nadal pozostaje w sferze hipotez.

Wartości referencyjne wydzielenie tryptazy po aktywacji komórki tłuszcznej

Oznaczenie stężenia tryptazy wykorzystywane jest jako wskaźnik aktywacji komórki tłuszcznej w chorobach zapalnych. Dostępny na rynku referencyjny zestaw Unicap 100 firmy Phadia, umożliwił oznaczenie całkowitego stężenia tryptazy.

Badanie wykonane przez producenta w grupie 126 zdrowych dzieci i dorosłych, (61 mężczyzn i 65 kobiet) bez klinicznych cech stymulacji komórek tłuszcznych wykazało że zakres stężeń tryptazy w surowicy krwi wynosi: średnia geometryczna 3,8 µg/L, 95c=11,4 µg/L (rycina 1). Nie stwierdzono różnic w wartościach referencyjnych związanych z płcią lub wiekiem dawców[15].

Wzrost stężenia tryptazy w surowicy obserwuje się pomiędzy 3-6 godziną od początku reakcji anafilaktycznej (rycina 2). Powrót do wartości prawidłowych następuje w czasie 12-14 godzin po uwolnieniu [16].

Tryptaza w diagnostyce

Dłuższy okres półtrwania tryptazy w surowicy krwi sprawia, że jest ona lepszym wskaźnikiem diagnostycznym od histaminy. Dodatkowo histamina, może być uwalniana również przez inne komórki takie jak: bazofile, komórki prezentujące antygen i bakterie. Optymalny czas do oznaczenia tryptazy to okres pomiędzy 1-6 godziną po ekspozycji na alergen (szczyt wydzielania pomiędzy piętnastą minutą a drugą godziną, czas półtrwania w surowicy 1,5-2,5 godziny). Należy jednak pamiętać, że wyższy poziom tryptazy może być obserwowany w innych niż alergia anafilaktyczna chorobach i stanach takich jak gojenie ran i tworzenie blizn w których udział bierze komórka tłuszczna.

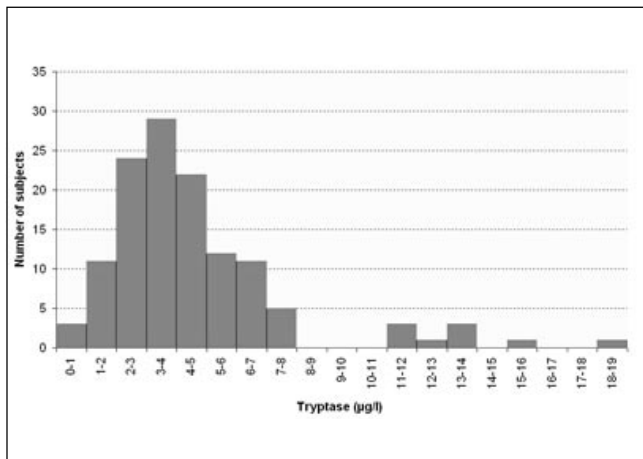
Sugeruje się, że do trzeciej doby od zgonu z powodu anafilaksji utrzymywać się może podwyższony poziom tryptazy pobieranej *post mortem* [17]. Takie oznaczanie tryptazy z surowicy krwi w przypadku podejrzeń reakcji anafilaktycznych jest przydatne w większości przypadków parenteralnej penetracji alergenów. Wykazały to badania pośmiertne przeprowadzone do 24 godziny od zgonu 19 ofiar. Poziom tryptazy >10 ng/ml stwierdzono u dziewięciu na dziewięć ofiar anafilaksji po ukąszeniu przez owady, dwóch z dwóch przypadków anafilaksji po lekach podanych parenteralnie, oraz sześciu z ośmiu przypadków alergii pokarmowej. Równocześnie poziom < 5 ng/ml obserwowano w 57 przypadkach kontroli surowicy pobranych *post mortem* z innych niż anafilaksja powodów [18].

W diagnostyce chorób alergicznych u osób chorych na astmę atopową i alergiczny nieżyt nosa stwierdzono podwyższone stężenie tryptazy w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych, i popłuczynach nosowych po prowokacjach ze swoim alergenem [19,20].

Nie wykazano przydatności tryptazy jako markera alergicznej reakcji zapalnej w przewodzie pokarmowym w diagnostyce alergii pokarmowej z użyciem podwojenie ślepej próby pokarmowej kontrolowanej *placebo* [21].

Oznaczenie poziomu tryptazy w surowicy krwi znalazło szrokie zastosowanie w diagnostyce mastocytozy. Poziom tryptazy >20-25 µg/l (WG WHO 2001) stanowi jedno z kryteriów diagnostycznych rozpoznania choroby, jakkolwiek nie jest ona swoim markerem dla mastocytozy, a o rozpoznaniu decydują również cechy kliniczne oraz obraz histopatologiczny szpiku kostnego

Wśród pacjentów uczulonych na jad owadów przeprowadzono badania określające stężenie tryptazy w surowicy krwi. Zaobserwowano korelację pomiędzy stopniem ciężkości reakcji anafilaktycznej u pacjentów uczulonych na jad owadów a stężeniem



Rycina 1

Poziom tryptazy zmierzony w grupie 126 zdrowych dzieci i dorosłych [Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani A- M, Van der Zwan JK, Van der Linden P-W G. Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systematic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1994;14(3):190-204].

Level of tryptase measured in a group of 126 healthy children and adults.

badanego enzymu. Wśród pacjentów z łagodnymi reakcjami poziomy tryptazy były prawidłowe W grupie chorych ze stężeniami tryptazy >13,5 µg/l w 30% występowały reakcje uogólnione, a dokładniejsze badania pozwoliły na rozpoznanie mastocytozy wśród 7% uczulonych na jad owadów [22].

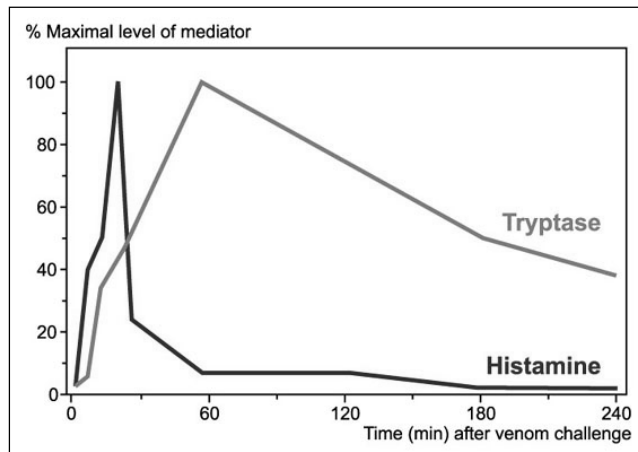
W ogólnych zaleceniach dotyczących immunoterapii alergii na jad owadów błonkoskrzydłych zwraca się uwagę, że podwyższony poziom tryptazy w surowicy krwi oraz wiążąca się z nim w części przypadków mastocytoza stanowią czynniki rozwoju reakcji anafilaktycznej wśród pacjentów uczulonych na jad owadów [23].

Podsumowując badania dotyczące przydatności oznaczania tryptazy w surowicy wskazują na przydatność takich oznaczeń w reakcjach anafilaktycznych i pokrzywkach, w diagnostyce mastocytozy oraz w określaniu grup ryzyka wśród chorych odczulanych na jad owadów. Potwierdzona została przydatność oznaczania tryptazy w popłuczynach nosowych i oskrzelowych w próbach ekspozycyjnych z alergenami. Inne wyniki badań dotyczące oznaczania jej stężenia w surowicy osób z alergią pokarmową, atopowym zapaleniem skóry są zróżnicowane i niejednoznaczne.

Zastosowanie oznaczania tryptazy w innych niż reakcja anafilaktyczna stanach zapalnych zwłaszcza w chorobach autoimmunologicznych jest dodatkowo utrudnione niejasną rolą mastocyta w tych schorzeniach.

Piśmiennictwo

1. **Glennier GG & Cohen LA** (1960) *Nature* 185, 846-847
2. **Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D et al.** The human mast cell: functions in physiology and disease. *Frontiers in Bioscience* 2001; 6: D1109-27.
3. **Gell PG, Coombs RA, Lachmann PF, Eds.** *Clinical Aspects of Immunology*; Pepys J. Atopy.. Oxford, Blackwell Scientific ed3, 1975:877-902.
4. **Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA.** Mastcells. *Physiol Rev* 1997; 77: 1033-1079.
5. **Galli SJ, Nakae S, Tsai M.** Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6: 135-142
6. **Marone G. Ed.** Human basophils and mast cells. Biological aspects; Dvorak AM Ultrastructural analysis of human mast cells and basophils. *Chemical Immunology* 1995; 61: 1-28.
7. **Marone G. Ed.** Human Basophils and Mast Cells: Biological Aspects. MacGlashan D.W. - Signal transduction and cytokine production by human basophils. *Chem Immunol.* Basel, Karger, 1995; 61: 88-113.



Rycina 2

Zmiany stężenia tryptazy i histaminy po wystąpieniu reakcji anafilaktycznej.

[Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, Bokhari R and Dull D: Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989;83:1551-1555.]

Changes of tryptase and histamine concentrations after the anaphylactic reaction.

8. **Kitamura Y, Go S, Hatanaka K.** Decrease of mast cells in W/Wv mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 1978; 52: 447-452.
9. **Benoist C, Mathis D.** Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 2002; 420: 875-878.
10. **Blank U, Rivera J.** The ins and outs of IgE dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol* 2004; 25: 266-273.
11. **Galli SJ, Nakae S, Tsai M.** Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6: 135-142.
12. **Hallgren J, Pejler G.** Biology of mast cell tryptase - an inflammatory mediator. *FEBS J* 2006; 273: 1871-1895.
13. **Pereira PJ, Bergner A, Macedo-Ribeiro S, Huber R, Matschiner G, Fritz H, Sommerhoff CP, Bode W.** Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* 1998; 392: 306-311.
14. **Hallgren J, Spillmann D, Pejler G.** Structural requirements and mechanism for heparin-induced activation of a recombinant mouse mast cell tryptase, mouse mast cell protease-6: formation of active tryptase monomers in the presence of low molecular weight heparin. *J Biol Chem* 2001; 276: 42774-42781.
15. **Schwartz LB, Bradford TR, Rouse C, Irani A- M, Van der Zwan JK, Van der Linden P-W G.** Development of a new, more sensitive immunoassay for human tryptase: use in systematic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 14: 190-204.
16. **Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, Bokhari R, Dull D.** Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest* 1989; 83: 1551-1555
17. **Fisher MM, Baldo BA.** Anaphylaxis during anaesthesia. Current aspects of diagnosis and prevention. *Europ J Anaesthesiol* 1994; 4: 263-284.
18. **Yunginger JW, Nelson DR, Squillace DL, et al.** Laboratory investigation of deaths due to anaphylaxis. *Journal of Forensic Sciences* 1991; 36: 857-865.
19. **Jacobi HH, Skov PS, Kampen GT et al.** Histamine and tryptase in nasal lavage fluid following challenge with methacholine and allergen. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 83-91.
20. **Wenzel SE, Fowler AA, Schwartz LB.** Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge: in vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Resp Dis* 1988; 137: 1002-1008.
21. **Bartuzi Z.** Stężenie tryptazy w surowicy po prowokacji swoistym alergenem metodą DBPCFC u pacjentów z alergią pokarmową. *Alergia Astma Immunologia* 2004; 9: 204-208
22. **Haeberli G, Bronnimann M, Hunziker T et al.** Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy. *Clini Exp Allergy* 2003; 33: 1216-20
23. **Escirbano L, Akin C, Castells M et al.** Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol* 2002; 81: 677-690.