

MICHAŁ BIJAK, MICHAŁ BŁAŻEJ PONCZEK, PAWEŁ NOWAK

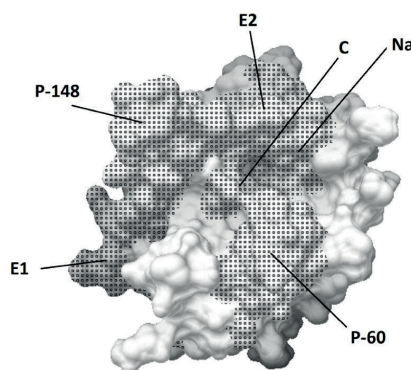
*Katedra Biochemii Ogólnej
Uniwersytet Łódzki
Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
E-mail: mbijak@biol.uni.lodz.pl
mponczek@biol.uni.lodz.pl
pnowak@biol.uni.lodz.pl*

KOMÓRKOWA ODPOWIEDŹ NA DZIAŁANIE TROMBINY

WPROWADZENIE

Trombina, znana również jako aktywny czynnik II krzepnięcia, jest osoczną proteazą serynową rozszczepiającą w białkach wiązania peptydowe znajdujące się po karboksylowej stronie argininy (BECKER i SPENCER 1998). Aktywność enzymu regulowana jest allosterycznie przez jony Na^+ (DI CERA 2003, 2008). Częsteczka trombiny zbudowana jest z 2 polipeptydowych łańcuchów: mniejszego łańcucha A, złożonego z 36 aminokwasów, który nie posiada udokumentowanej biologicznej roli, i łańcucha B, złożonego z 259 aminokwasów. Łańcuchy te połączone są ze sobą kowalencyjnym wiązaniem disiarczkowym (DI CERA 2003). Trombina posiada masę 37 kDa i nie zawiera w swojej cząsteczce reszt GLA (ADAMS i HUNTINGTON 2006). W cząsteczce trombiny można wyróżnić 4 miejsca, które są odpowiedzialne za jej biologiczną funkcję: miejsce zewnętrzne I (ang. exosite I), miejsce zewnętrzne II (ang. exosite II), miejsce zawierające centrum katalityczne i miejsce wiązania jonów sodowych (Ryc. 1) (LICARI i KOVACIC 2009). Miejsce zewnętrzne I jest elektrododatnim miejscem wiązania anionów i odpowiedzialne jest za wiązanie przede wszystkim jednego z głównych substratów dla trombiny; fibrynogenu. Przyłączane są tu także receptory PAR, a dokładnie PAR-1, PAR-3 i PAR-4 oraz trombomodulina (LANE i współaut. 2005, BODE 2006). Po przeciwległej stronie białka znajduje się miejsce zewnętrzne II, które także jest elektrododatnim miejscem wiązania anionów (CRAWLEY i

współaut. 2007). Miejsce zewnętrzne II jest miejscem, w którym następuje wiązanie polisacharydu – heparyny, będącej zarazem bardzo silnym pośrednim inhibitorem trombiny. Interakcja ta nie należy do specyficznych, ma naturę całkowicie jonową (CARTER i współaut. 2005). Centrum aktywne trombiny jest zlokalizowane wewnątrz cząsteczki w obrębie tzw. katalitycznej triady, do której



Ryc. 1. Struktura cząsteczki trombiny.

Centrum aktywne zostało zaznaczone literą C. Miejsce zewnętrzne I literą E1, miejsce zewnętrzne II literą E2, pętla- γ literą P-148, natomiast pętla-60 oznaczona jest jako P-60. Miejsce wiązania jonów Na^+ zaznaczone zostało jako Na. Obraz wygenerowano w oparciu o strukturę trombiny 1FPH w programie PMV-1.5.6rc1 z pakietu AutoDockTools (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>) (wg SANNERA 1999, zmieniona).

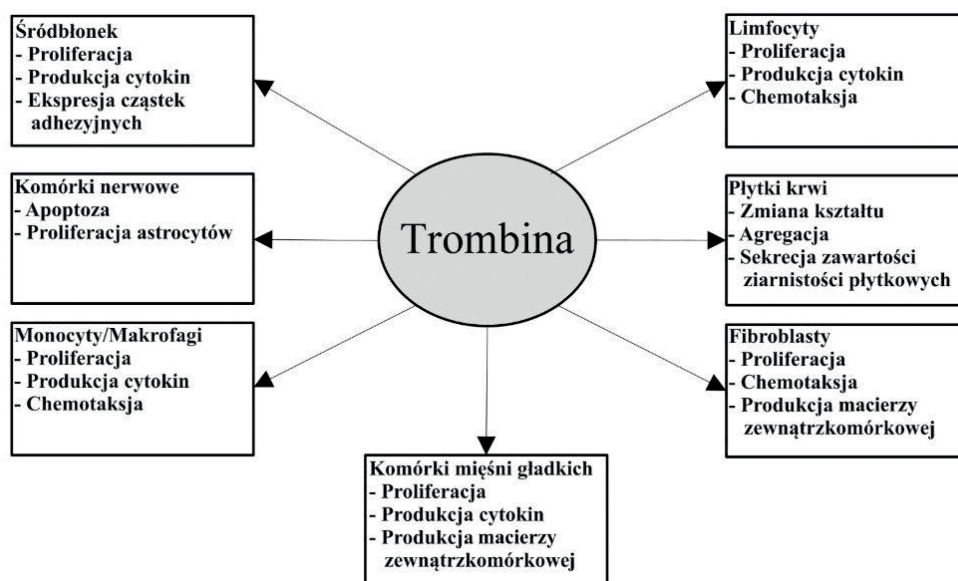
należą His 43, Asp 99 i Ser 205, znajdujące się w łańcuchu B trombiny (OLAS i WACHOWICZ 1998), lub His 57, Asp 102 i Ser 195, jeżeli przyjmuje się numerację według sekwencji chymotrypsyny. Triada jest umiejscowiona w zagłębieniu utworzonym przez dwie pętle zwane: pętlą-60, znajdującą się pomiędzy 58 a 64 aminokwasem i pętlą- γ , zwaną również pętlą-148 zlokalizowaną pomiędzy 144 a 155 aminokwasem (Ryc. 1). Pętla-60 jest regulatorem aktywności, poprzez udział w wiązaniu substratów do centrum aktywnego (DE CRISTOFARO i DE CANDIA 2003). Miejsce wiązania jonów Na^+ znajduje się wewnątrz cylindrycznej struktury, utworzonej przez trzy struktury β w łańcuchu B (DI CERA i współaut. 1995). W zależności od tego czy

trombina związana jest z jonami Na^+ można wyróżnić dwie formy: niezwiązaną z jonami Na^+ , nazywaną też formą „wolną” trombiny, i związaną z jonami Na^+ , która bywa nazywana formą „szybką” trombiny. Ich stosunek w warunkach fizjologicznego stężenia jonów Na^+ (140 mmol/l) wynosi 2:3. Obie te formy enzymu wykazują różne powinowactwo do różnych substratów. Trombina związana z jonami Na^+ jest uznawana za formę odpowiedzialną za właściwości prokoagulacyjne i jest specyficzna dla fibrynogenu, czynników krzepnięcia, receptorów PAR. Natomiast niezwiązana z jonami Na^+ wykazuje specyficzność w kierunku białka C i jest uznawana za formę o właściwościach antykoagulacyjnych (DI CERA 2003, HUNTINGTON 2008).

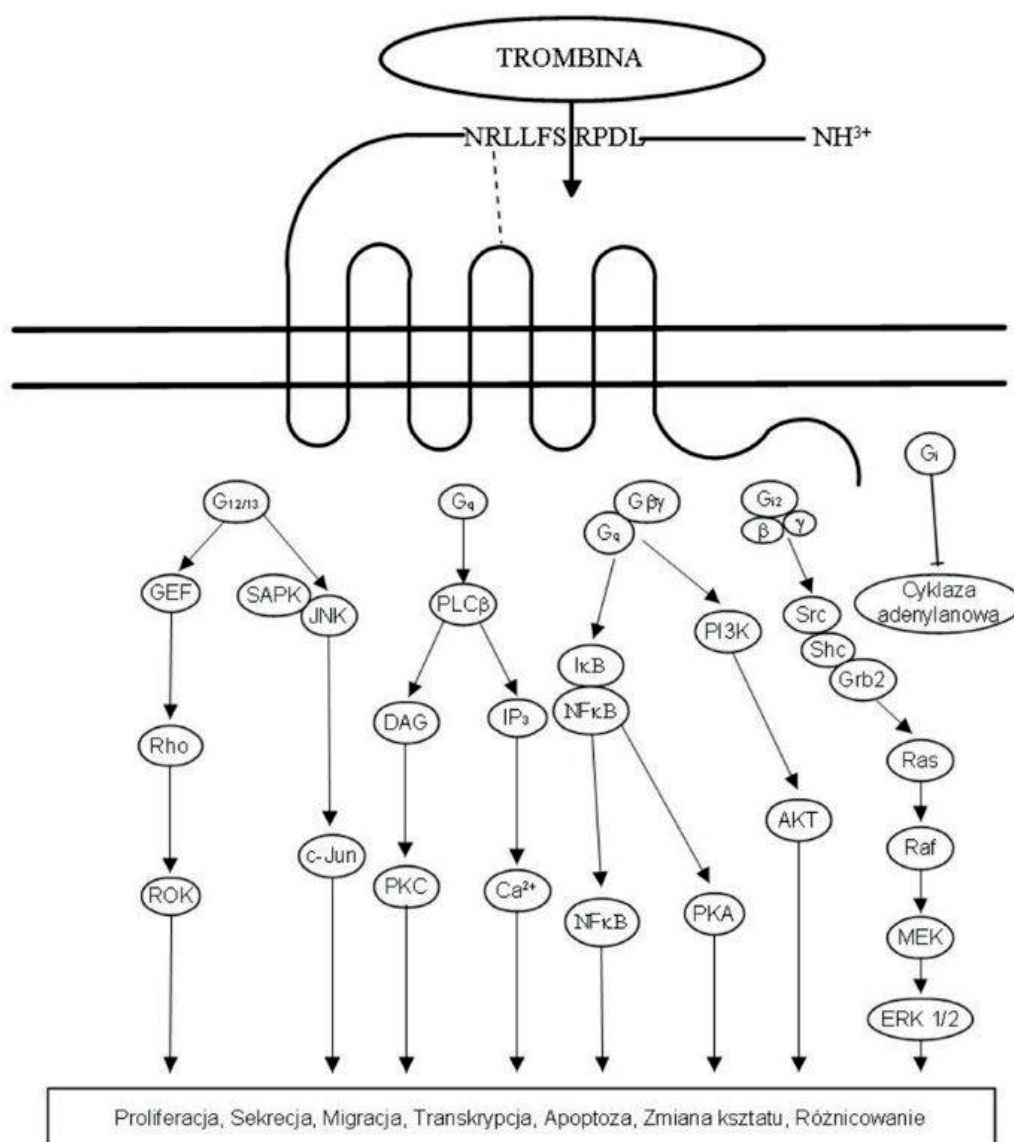
BUDOWA I AKTYWACJA RECEPTORA PAR

Odkrycie w 1991 r. pierwszego receptora PAR (ang. protease-activated receptor), czyli receptora aktywowanego przez proteazę było bardzo ważnym etapem, gdyż pozwoliło to wyjaśnić, w jaki sposób trombina, czyli enzym, który głównie kojarzony był z tworzeniem włókniaka, potrafi pobudzać szereg różnych komórek znajdujących się w ludzkim organizmie (Ryc. 2) (SCHMIDLIN i BUNNETT 2001). Receptory PAR należą do rodziny 7 transbłonowych receptorów związanych z białkami G (ang. G protein-

coupled receptor, GPCR; wcześniejsza nazwa: seven transmembrane domain receptor, STDR) (LICARI i KOVACIC 2009). Receptory te posiadają trzy domeny: N-terminalną, która jest na zewnątrz komórki, domenę centralną siedmiokrotnie przechodzącą przez błonę komórkową i domenę C-terminalną znajdującą się wewnątrz komórki (MACFARLANE i współaut. 2001). Do tej pory poznano 4 typy receptorów PAR, są to PAR-1, PAR-2, PAR-3 i PAR-4, przy czym trombina jest zdolna do aktywacji PAR-1,



Ryc. 2. Schemat przedstawiający odpowiedź komórek na działanie trombiny (wg GOLDSACKA i współaut. 1998, zmieniona).



Ryc. 3. Schemat aktywacji receptora PAR na przykładzie receptora PAR-1 z najważniejszymi szlakami wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału (wg OSSOVSKIEY i BUNNETTA 2004, zmieniona).

PAR-3 i PAR-4. Natomiast głównym aktywatorem PAR-2 jest trypsyna. Receptory PAR obecne są na wielu typach komórek. Dużą ekspresję wykazują płytki krwi, komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, monocyty, limfocyty T, neutrofile, fibroblasty, komórki mięśniowe, komórki układu nerwowego, a także komórki nowotworowe (SCHMIDLIN i BUNNETT 2001). Trombina nie jest ligandem dla tych receptorów, a enzymem powodującym ich trawienie. Aktywacja receptorów PAR przez trombinę polega na przecięciu zewnątrzkomórkowej, N-terminalnej domeny receptora powodując powstanie nowego N-końca, który wiąże się ze środkową zewnątrzkomórkową pętlą tego samego receptora. Połączenie tych

dwóch domen powoduje aktywację receptora (Ryc. 3) (TREJO 2003, DI CERA 2008). W zależności od typu receptora, proteolityczne cięcie następuje w różnym miejscu. W PAR-1 rozerwaniu ulega wiązanie pomiędzy Arg a Ser w sekwencji TLDPRSFLLR. PAR-3 jest aktywowany dzięki rozczepieniu wiązania pomiędzy Lys a Thr znajdującymi się w sekwencji TLPIKTFRGA. Aktywacja PAR-4 jest natomiast możliwa dzięki przecięciu wiązania między Arg a Gly w sekwencji LPAPRGYPGQV (KAWABATA i KURODA 2000). Wiązanie trombiny do receptora jest nieodwracalne i zawsze przebiega w stosunku 1:1, dlatego stopień aktywacji komórek poprzez receptory PAR zależy od lokalnego stężenia trombiny (MACFARLANE

i współaut. 2001, OSSOVSKAYA i BUNNETT 2004). W konsekwencji aktywowania receptorów PAR następuje uruchomienie wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału. Przekazywanie sygnału może przebiegać na wielu różnych drogach, w zależności od tego, które z białek G jest zaangażowane w ten proces. Powoduje to zróżnicowaną odpowiedź komórki na działanie trombiny (Ryc. 3) (OSSOVSKAYA i BUNNETT 2004, STEINHOFF i współaut. 2005). Jedną z właściwości receptorów PAR jest ich zdolność do oddziaływania z trombiną tylko raz w „swoim życiu”, ponieważ aktywacja receptora jest procesem nieodwracalnym. Zakończenie przekazywania sygnału przez PAR jest podobne do klasycznych mechanizmów tzw. „odczulania receptorów”, jakie zostały opisane dla wielu innych receptorów związanych z białkami G. Mechanizm polega na tym, że do aktywnego receptora

przyłącza się kinaza receptorów G (GRK); w przypadku PAR-1 największe znaczenie mają kinazy GRK 2 i GRK 3. GRK należą do kinaz serynowo-treoninowych i powodują fosforylację wewnątrzkomórkowego C-końca receptora. Wyzwała to translokację i przyłączenie się β -arrestyny do fosforylowanego końca receptora, blokując interakcję receptora z białkami G i w ten sposób hamując przekazywanie sygnału (MACFARLANE i współaut. 2001, OSSOVSKAYA i BUNNETT 2004). PAR obecne w błonie komórkowej ulegają wymianie. Zużyte receptory są usuwane na drodze endocytozy zależnej od klatryny i dyneiny, a następnie ulegają lizosomalnej degradacji wewnątrz komórki. Zniszczone receptory są zastępowane nowymi receptorami, które pochodzą z systemu błon wewnątrzkomórkowych (DERY i współaut. 1998, TREJO 2003, OSSOVSKAYA i BUNNETT 2004).

TROMBINA A PŁYTKI KRWI

Już w 1917 r. WRIGHT i MINOT wykazali, że trombina ma wpływ na aktywność płytek krwi. Trombina jest jednym z najsilniejszych agonistów płytek krwi występujących w warunkach *in vivo*. Aktywacja płytek następuje przy stężeniu enzymu niższym niż potrzebnym do przekształcenia fibrynogenu w fibrynę. W odpowiedzi na trombinę następuje zmiana kształtu płytki, sekrecja zawartości znajdujących się w ziarnistościach płytkowych i agregacja płytek (LAPETINA 1990). Za odpowiedź płytek na działanie trombiny odpowiedzialne są głównie receptory należące do rodziny receptorów PAR oraz GPIIb α wchodząca w skład kompleksu GPIIb-IX-V. Na powierzchni ludzkich płytek krwi występują receptory PAR-1 i PAR-4. Do aktywacji PAR-1 dochodzi przy mniejszych stężeniach trombiny niż ma to miejsce w przypadku receptorów PAR-4 (BRASS 2001). Z receptorem PAR-1 związane są trzy białka G: G₁₂, G_q i G_i, natomiast z PAR-4 związane są białka G₁₂ i G_q (BRASS 2001, MACKIE i współaut. 2002). Poprzez białko G₁₂ następuje uruchomienie szlaku kinazy Rho, który prowadzi do zmiany kształtu płytek (BRASS 2001). Białko G_q wywołuje aktywację fosfolipazy C β (PLC β), która powoduje hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu (PIP₂) do diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforanu (IP₃). IP₃ powoduje wzrost wewnątrzkomórkowe-

go stężenia jonów Ca²⁺, natomiast DAG aktywuje kinazę białkową typu C (PKC). PKC, wraz ze wzrostem stężenia Ca²⁺, powoduje zmianę kształtu płytek, ich agregację i sekrecję zawartości wewnątrzkomórkowych ziarnistości (BRASS 2003, OFFERMANN 2006). Zmiana kształtu spowodowana jest poprzez reorganizację cytoszkieletu. Reorganizacja ta jest regulowana poprzez kinazę łańcucha lekkiego miozyny (MLCK), której aktywność jest zależna od jonów Ca²⁺. Sekrecja zachodzi dzięki temu, iż PKC w obecności jonów Ca²⁺ fosforyluje plektystrynę, co prowadzi do uwolnienia ziarnistości płytkowych. Dochodzi też do ekspozycji selektyny P. Natomiast tworzenie agregatów spowodowane jest tym, że PKC i jony Ca²⁺ aktywują integrynę $\alpha_{IIb}\beta_3$, dzięki czemu receptor ten nabywa zdolności do trwałego przyłączania fibrynogenu i uczestniczy w agregacji (OLAS 2001). Trombina wpływa na płytki także poprzez receptory znajdujące się w kompleksie GPIIb-IX-V. Dzięki połączeniu z GPIIb α znajdującym się w tym kompleksie trombina, poprzez łatwiejszy dostęp może także efektywniej aktywować receptor PAR-1 i PAR-4 (DE CRISTOFARO i DE CANDIA 2003). Trombina połączona z GPIIb α może również aktywować płytki przez szlak kinaz Src i PI3K (ADAM i współaut. 2003, BRASS 2003).

EFEKT DZIAŁANIA TROMBINY NA NACZYNIA KRWIONOŚNE

Trombina, poprzez receptor PAR-1 obecny na komórkach śródbłonna i komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych, może wpływać na napięcie ściany naczyń krwionośnych (COUGHLIN 2001). Zmniejszenie napięcia naczyń krwionośnych przez śródbłonek jest spowodowane przez tlenek azotu (NO) i prostacyklinę (PGI₂) (STEINBERG 2005, HANSEN i współaut. 2008). NO odpowiada za tzw. wczesną relaksację, natomiast prostacyklina jest odpowiedzialna za późną relaksację śródbłonna (HIRANO i KANAIDE 2003). Za syntezę tlenku azotu w komórkach śródbłonna odpowiedzialna jest śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (eNOS), która jest zależna od jonów Ca²⁺ i kalmoduliny (NATHAN i XIE 1994). Aktywacja przez trombinę PAR-1 powoduje wzrost stężenia jonów Ca²⁺ i w ten sposób stymuluje aktywność eNOS, powodując zwiększoną syntezę tlenku azotu z argininy. Trombina poprzez aktywację kinazy białkowej typu B (AKT/PKB) i kinazy białkowej typu A (PKA) powoduje także fosforylację

eNOS. PKB fosforyluje eNOS na Ser 1177 i w ten sposób wywołuje niezależną od jonów Ca²⁺ syntezę tlenku azotu. Fosforylacja Ser 615 zwiększa natomiast wrażliwość syntazy tlenku azotu na jony Ca²⁺ i kalmodulinę. Fosforylacja eNOS przez PKA na Ser 615 i Ser 633 zwiększa dwukrotnie aktywność tego enzymu. Trombina również aktywuje pompę Na⁺H⁺, powodując alkalizację wnętrza komórki i w ten sposób tworzy środowisko sprzyjające działaniu eNOS (HIRANO i KANAIDE 2003). Trombina pośrednio wpływa na aktywność cyklooksygenazy 2 (COX-2) śródbłonna, powodując zwiększenie produkcji prostaglandyn i prostacykliny, w ten sposób wpływa na późną fazę wazorelaksacji (HOLLISTON i współaut. 2002). Aktywacja dwóch kinaz białkowych, MAPKAP2 i SAPK, powoduje fosforylację małego białka szoku cieplnego HSP27, które jest odpowiedzialne za indukowany trombiną skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych (BROPHY i współaut. 1998, KNOEPP i współaut. 1999).

ZNACZENIE TROMBINY W PROCESACH ZAPALNYCH

Generowana w warunkach *in vivo* trombina posiada właściwości prozapalne. Pod wpływem trombiny, która oddziałuje z receptorami PAR-1, komórki śródbłonna wykazują na swojej powierzchni ekspresję P-selektyny i E-selektyny, białek adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1. Wytwarzane są też: interleukiny (IL-6, IL-8), czynnik aktywujący płytki krwi (PAF) i białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1) (DUGINA i współaut. 2002). Następuje także aktywacja COX-2 (COUGHLIN i CAMERER 2003). Czynniki chemotaktyczne powodują migrację płytek krwi i leukocytów do miejsca ich uwalniania, natomiast E-selektyna, ICAM-1 i VCAM-1 „toczenie” się granulocytów, limfocytów, makrofagów i płytek krwi po komórkach śródbłonna (SAWICKA 2000). Aktywacja receptora PAR-1 w monocytach powoduje zwiększenie wydzielania cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor α , TNF α), IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, następuje także zmniejszenie sekrecji IL-12. PAR-1 jest także obecny na limfocytach T, poprzez jego aktywację dochodzi do ich proliferacji i wydzielania prozapalnych cytokin. Trombina powoduje również degranulację mastocytów

(SHRIVASTAVA i współaut. 2007) i aktywację komórek NK, stymulując je do uwalniania IL-2 (RAMACHANDRAN i HOLLENBERG 2008). Za główny mechanizm odpowiedzi zapalnej indukowanej przez trombinę uznaje się aktywację NF κ B, poprzez degradację fosforylowanego I κ B przez proteasom. Inaktywacja I κ B prowadzi do ekspresji ICAM-1, VCAM-1, IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , MCP-1, PAF (STRUKOVA 2001). Trombina indukuje także ekspresję czynnika przyspieszającego rozkład (ang. decay accelerating factor, DAF) w komórkach śródbłonna, który powoduje zwiększenie kinetyki rozszczepiania składowych C3 i C5 układu dopełniacza (DUGINA i współaut. 2002). Trombina pośrednio, poprzez aktywację białka C, ma też właściwości przeciwzapalne. Aktywne białko C (APC) łączy się z śródbłonkowym receptorem dla białka C (EPCR) tworząc kompleks APC-EPCR. Takie połączenie powoduje odpowiedź komórek śródbłonna w postaci zmniejszenia się syntezy cytokin prozapalnych. APC łączy się również z monocytami powodując zahamowanie wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ i zahamowanie szlaku NF κ B (ESMON 2004).

ZNACZENIE TROMBINY W PROCESACH NAPRAWCZYCH

Powstała w miejscu uszkodzenia naczynia aktywna trombina koordynuje procesy naprawcze w tkankach, stymulując proliferację i migrację komórek śródbłonka, nabłonka, fibroblastów i komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych. Efekt naprawczy jest ściśle związany z efektem zapalnym, gdyż w naprawie biorą udział zwerbowane przez wydzielanie chemokin (takich jak MCP-1) komórki układu odpornościowego, które również pod wpływem trombiny wydzielają różne czynniki wzrostu (STRUKOVA 2001). Trombina powoduje także migrację komórek i syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej, dzięki czemu dochodzi do remodelowania tkanek (COUGHLIN i CAMERER 2003). Poprzez aktywację receptorów PAR następuje stymulacja fibroblastów do produkcji czynnika wzrostu tkanki łącznej (ang. connective tissue growth factor, CTGF), który jest czynnikiem mitogennym dla tych komórek, a także stymuluje je do produkcji kolagenu i fibronektyny (CHAMBERS i współaut. 2000). Podobna stymulacja komórek mięśni gładkich powoduje ich

proliferyację, syntezę i wydzielanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF), czyli czynnika, który jest jednym z głównych stymulatorów proliferacji komórek śródbłonka (WEBER i GRIENDLING 2004). VEGF jest wydzielany także przez aktywowane trombina płytki krwi. W komórkach śródbłonka trombina powoduje ekspresję receptora dla czynnika wzrostu śródbłonka (ang. vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), dzięki czemu następuje zwiększona odpowiedź tych komórek na czynnik wzrostu i naprawa uszkodzonego naczynia (PATTERSON i współaut. 2001). Trombina powoduje również w komórkach śródbłonka destabilizację połączeń wewnątrzkomórkowych i oddziaływań komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, dzięki czemu ułatwiona jest migracja komórek. Efekt ten jest związany z aktywacją przez trombinę metaloproteazy 2 (MMP-2), enzymu o właściwościach kolagenazy i elastazy (STRUKOVA 2001).

UDZIAŁ TROMBINY W PROCESACH NOWOTWOROWYCH

Od połowy lat 90. ubiegłego stulecia zaczęto sugerować, że trombina odgrywa ważną rolę w proliferacji i przerzutowaniu komórek nowotworowych (HOLLENBERG i HOULE 2005). W wielu liniach komórkowych zmienionych nowotworowo zaobserwowano wzrost ekspresji receptora PAR-1. Wzrost ten jest ściśle związany z inwazyjnością guza (LICARI i KOVACIC 2009). Trombina poprzez aktywację receptorów PAR-1 aktywuje szlaki Ras, PKC i MAPK, co powoduje proliferację komórek, a w konsekwencji może prowadzić do wzrostu guza (XIE i współaut. 2005). Kluczowym czynnikiem zależnym od trombiny w nowotworzeniu jest powstawanie nowych naczyń okołotworowych. Zaktywowane przez trombinę receptory PAR powodują zwiększenie ekspresji genów dla czynników wzrostowych: VEGF, płytkowego czynnika wzrostu (ang. platelet derived growth factor, PDGF), transformującego czynnika β (ang. transforming growth factor β , TGF- β), za-

sadowego czynnika wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor, bFGF), a także receptora VEGFR. Trombina powoduje w komórkach śródbłonka aktywację receptora VEGFR-2, który jest odpowiedzialny za proces angiogenezy. Trombina również indukuje syntezę integryny $\alpha\beta_3$, która jest markerem angiogenezy w komórkach nowotworowych. Integryna ta należy do białek, które wchodzi w interakcję z komórkami śródbłonka. W początkowych etapach przerzutowania guza duże znaczenie ma także indukcja biosyntezy kadheryn, które są odpowiedzialne za oddziaływanie adhezyjne komórek nowotworowych (PALATYŃSKA-ULATOWSKA i współaut. 2007). Trombina powoduje aktywację wydzielanych przez śródbłonek metaloproteaz, głównie MMP-1 i MMP-2, które degradują kolagen IV, co jest związane z lokalną degradacją błony podstawnej, ułatwiając w ten sposób migrację komórek nowotworowych (MARAGOUidakis i współaut. 2000).

ZNACZENIE TROMBINY W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

Obecność receptorów PAR stwierdzono także w komórkach układu nerwowego. Ich ekspresję wykazują m.in. neurony, astrocyty i oligodendrocyty. Dzięki obecności tych receptorów trombina odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego, włączając w to zarówno zaangażowanie w choroby neurodegeneracyjnych, jak i działanie neuroprotekcyjne (LUO i współaut. 2007). Generowanie trombiny w mózgu następuje natychmiast po przerwaniu bariery krew-mózg na skutek krwawienia wewnątrzczaszkowego lub uszkodzenia tej bariery na drodze zapalnej. Źródłem trombiny, a dokładnie jej zymogenu protrombiny, są również neurony, astrocyty i migrujące komórki zapalne (LICARI i KOVACIC 2009). Zaobserwowano wzrost zarówno stężenia samego białka, jak i ilości mRNA dla protrombiny w neuronach podczas choroby Parkinsona i Alzheimer (LUO i współaut. 2007). Trombina w wyższych stężeniach prowadzi do uszkodzenia komórek układu nerwowego i ich śmierć. Sugerować to może udział tego enzymu w chorobach neurodegeneracyjnych. W chorobie Alzheimer odkryto spadek poziomu endogennych inhibitorów trombiny (głównie Antytrombiny) (MACFARLANE i współaut. 2001). Poprzez hydrolizę receptora PAR-1 następuje aktywacja szlaku RhoA, który jest odpowiedzialny za indukcję apoptozy w komórkach neuronalnych (LUO i współaut.

2007). Poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} wywołanego aktywacją PAR-1, następuje uwalnianie glutaminianu z astrocytów (Xi i współaut. 2003). Trombina poprzez wzrost stężenia jonów Ca^{2+} , aktywacji szlaku ERK1/2 i NF κ B może też powodować aktywację mikrogleju (odgrywającego istotną rolę w chorobach neurodegeneracyjnych) (LUO i współaut. 2007). Trombina w układzie nerwowym może indukować także stan zapalny, poprzez aktywowanie szlaku przemiany arachidonianu i syntezę cytokin zapalnych (IL-1, IL-6, TNF- α) (SUO i współaut. 2004). Dość istotnym czynnikiem jest indukowana trombiną w astrocytach synteza tlenu azotu. Wzmoczona produkcja tego związku obserwowana jest w chorobie Alzheimer i Parkinsona. Aktywacja szlaku ERK 1/2 powoduje proliferację astrocytów, co potwierdza fakt, że aktywacja PAR-1 po uszkodzeniach mózgu prowadzi do astrocytozy i jest związana z neurodegeneracją. Trombina aktywuje również metaloproteazę 2, która może powodować osłabienie, a nawet przerwanie bariery krew-mózg. W przeciwieństwie do wysokich stężeń trombiny generowanej po uszkodzeniach mózgu i działającej neurodegeneracyjnie, niskie stężenia wykazują działanie ochronne przed uszkodzeniami wywołanymi przez glutaminian, β -amyloid, reaktywne formy tlenu oraz hipoglikemię (LUO i współaut. 2007).

PODSUMOWANIE

Odpowiedź na działanie trombiny to nie tylko krzepnięcie krwi poprzez aktywację fibrynogenu do fibryny, ale szereg procesów obejmujących płytki krwi, komórki śródbłonna, limfocyty, monocyty/makrofagi, fibroblasty, komórki mięśni gładkich, a nawet komórki nerwowe. Trombina stymuluje ekspresję białek adhezyjnych, produkcję cytokin i składników macierzy zewnątrzkomórkowej, proliferację, chemotaksję, apoptozę komórek oraz zmianę kształtu, agregację oraz sekrecję płytek krwi. Tak szerokie działanie trombiny przekłada się nie tylko na jej rolę w powstawaniu zaburzeń związanych z układem krążenia i ze stanem naczyń krwionośnych, ale także na patogenezę procesów zapalnych,

chorób nowotworowych oraz neurodegeneracyjnych. Szerokie spektrum działania trombiny umożliwia opracowanie licznych metod regulacji odpowiedzi komórkowej poprzez różnego rodzaju inhibitory stosowane w farmakoterapii. Najwcześniej zastosowanym w farmakoterapii inhibitorem trombiny jest heparyna. Działanie heparyny na trombinę jest pośrednie i oparte na tworzeniu z antytrombiną kowalencyjnego kompleksu antytrombina-heparyna (ATH), przez co zwiększa się zdolność antytrombiny do przyłączania się do trombiny. Jednak obecnie heparyna zostaje wypierana przez grupę tzw. bezpośrednich inhibitorów trombiny. Obecnie stosowane klinicznie są 3 parenteralne bezpośrednie in-

hibitory: hirudyna i biwalirudyna, które przyłączają się do centrum aktywnego i miejsca zewnętrznego I trombiny oraz argatroban wiążący się jedynie z centrum aktywnym enzymu. Nową klasą obecnie znajdującą zastosowanie kliniczne są doustne bezpośrednie inhibitory trombiny: ximelagatran i dabigatran, które odwracalnie przyłączają się tylko do centrum aktywnego cząsteczki trombiny. Jednak ze względu na skutki uboczne ximelagatranu najbardziej obiecującym bezpośred-

nim inhibitorem trombiny, który może stanowić ważną alternatywę dla antagonistów witaminy K jest dabigatran. Dalsze badania są szansą na uzyskanie nowych preparatów, poza tymi obecnie dostępnymi w lecznictwie (BIJAK i BOBROWSKI 2010).

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała w ramach grantu Uniwersytetu Łódzkiego nr 506/810

KOMÓRKOWA ODPOWIEŹ NA DZIAŁANIE TROMBINY

Streszczenie

Trombina jest osoczną proteazą serynową generowaną podczas kaskady krzepnięcia krwi. Aktywna ludzka α -trombina posiada masę 37 kDa i jest zbudowana z 2 polipeptydowych łańcuchów (A i B) połączonych są ze sobą kowalencyjnym wiązaniem disiarczkowym. Trombina jest głównie kojarzona z procesami krzepnięcia i fibrynolizy, jednak enzym ten jest również zdolny do wywoływania biologicznej odpowiedzi różnych komórek znajdujących się w pobliżu miejsca jej tworzenia. Odpowiedź ta następuje poprzez receptory aktywowane przez proteazy (PAR – ang. Protease-Activated Receptor), które należą do rodziny 7 transbłonowych receptorów związanych z białkami G (GPCR – ang. G Protein-Coupled Receptor). Dużą ekspresję receptorów PAR wykazują płytki krwi, komórki śródbłónki naczyń krwionośnych, monocyty, limfocyty T, neutrofile, fibroblasty,

komórki mięśniowe, komórki układu nerwowego, a także komórki nowotworowe. Trombina wywołuje aktywację płytek krwi prowadząc do ich agregacji, zmiany kształtu i sekrecji zawartości znajdujących się w ziarnistościach płytkowych. Komórki śródbłónki aktywowane przez trombinę wykazują na swojej powierzchni ekspresję P-selektyny, E-selektyny i białek adhezyjnych (ICAM-1 i VCAM-1). Aktywacja receptora PAR-1 na monocytach skutkuje wzrostem wydzielania prozapalnych cytokin przez te komórki. Przekazywanie sygnału poprzez receptory PAR stymuluje wzrost, różnicowanie i proliferację komórek, co ma duże znaczenie podczas regeneracji tkanek. Trombina również sprzyja procesowi angiogenezy podczas rozwoju nowotworu, co ułatwia przeżutowaniu. Ten szeroki aspekt działania trombiny wskazuje, że enzym ten jest wielofunkcyjną proteazą serynową.

CELLULAR RESPONSE TO THROMBIN ACTION

Summary

Thrombin is plasma serine protease generated in the blood coagulation cascade. Active form of human thrombin: α -thrombin is a 36 kDa molecule consisting of 2 polypeptide chains (A and B) covalently linked by a single disulfide bond. Thrombin is mostly associated with blood coagulation and fibrinolysis. However, thrombin is also able to induce biological responses of different cells presented in the vicinity of enzyme generation. These responses are mediated by protease activated receptors (PAR), which are members of the 7-transmembrane G protein coupled receptors family. PARs are abundantly presented on blood platelets, endothelial cells, monocytes, T-lymphocytes, fibroblast, smooth muscle cells, neurons and tumor cells. Thrombin stimulates platelets activation leading to their aggre-

gation, shape change and secretion of the contents of platelet granules. PAR activation on endothelial cells and blood vessels smooth muscle cells causes vasodilation. Endothelial cells activated by thrombin also exhibit on their surface expression of P-selectin, E-selectin and adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1). Activation of PAR-1 receptor in monocytes results in increased secretion of proinflammatory cytokines. PAR signaling stimulates cell growth, differentiation and proliferation. These effects are important in healing of injured tissues. Thrombin promotes angiogenesis in developing tumors and facilitates their metastasis. The different effects of thrombin action indicate that this enzyme is one of the most multifunctional serine protease.

LITERATURA

- ADAM F., BOUTON M. C., HUISSE M. G., JANDROT-PERRUS M., 2003. *Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib alpha*. Trends Mol. Med. 9, 461–464.
- ADAMS T. E., HUNTINGTON J. A., 2006. *Thrombin-co-factor interactions: structural insights into regulatory mechanisms*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26, 1738–1745.

- BECKER R. C., SPENCER F. A., 1998. *Thrombin: structure, biochemistry, measurement, and status in clinical medicine*. J. Thromb. Thrombolysis. 5, 215-229.
- BIJAK M., BOBROWSKI M., 2010. *Znaczenie inhibitorów trombiny w farmakoterapii przeciwzakrzepowej*. Postępy Nauk Medycznych. 10, 819-825.
- BODE W., 2006. *Structure and interaction modes of thrombin*. Blood Cells Mol. Dis. 36, 122-130.
- BRASS L. F., 2003. *Thrombin and platelet activation*. Chest 124, 18-25.
- BRASS S., 2001. *Cardiovascular biology. Platelets and proteases*. Nature 413, 26-27.
- BROPHY C. M., WOODRUM D., DICKINSON M., BEALL A., 1998. *Thrombin activates MAPKAP2 kinase in vascular smooth muscle*. J. Vasc. Surg. 27, 963-969.
- CARTER W. J., CAMA E., HUNTINGTON J. A., 2005. *Crystal structure of thrombin bound to heparin*. J. Biol. Chem. 280, 2745-2749.
- CHAMBERS R. C., LEONI P., BLANC-BRUDE O. P., WEMBRIDGE D. E., LAURENT G. J., 2000. *Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1*. J. Biol. Chem. 275, 35584-35591.
- COUGHLIN S. R., 2001. *Protease-activated receptors in vascular biology*. Thromb. Haemost. 86, 298-307.
- COUGHLIN S. R., CAMERER E., 2003. *PARTicipation in inflammation*. J. Clin. Invest 111, 25-27.
- CRAWLEY J. T., ZANARDELLI S., CHION C. K., LANE D. A., 2007. *The central role of thrombin in hemostasis*. J. Thromb. Haemost. 5, 95-101.
- DE CRISTOFARO R., DE CANDIA E., 2003. *Thrombin domains: structure, function and interaction with platelet receptors*. J. Thromb. Thrombolysis. 15, 151-163.
- DERY O., CORVERA C. U., STEINHOFF M., BUNNETT N. W., 1998. *Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases*. Am. J. Physiol 274, 1429-1452.
- DI CERA E., 2003. *Thrombin interactions*. Chest 124, 11-17.
- DI CERA E., 2008. *Thrombin*. Mol. Aspects Med. 29, 203-254.
- DI CERA E., GUINTO E. R., VINDIGNI A., DANG Q. D., AYALA Y. M., WUYI M., TULINSKY A., 1995. *The Na⁺ binding site of thrombin*. J. Biol. Chem. 270, 22089-22092.
- DUGINA T. N., KISELEVA E. V., CHISTOV I. V., UMAROVA B. A., STRUKOVA S. M., 2002. *Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation*. Biochem. (Mosc.) 67, 65-74.
- ESMON C. T., 2004. *Crosstalk between inflammation and thrombosis*. Maturitas 47, 305-314.
- GOLDSACK N., CHAMBERS R., DABBAGH K., LAURENT G., 1998. *Molecule in focus Thrombin*. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 30, 641-646.
- HANSEN K. K., OIKONOMOPOULOU K., LI Y., HOLLENBERG M. D., 2008. *Proteinases, proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of cancer and diseases of the cardiovascular, musculoskeletal, nervous and gastrointestinal systems*. Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol. 377, 377-392.
- HIRANO K., KANAIDE H., 2003. *Role of protease-activated receptors in the vascular system*. J. Atheroscler. Thromb. 10, 211-225.
- HOLLENBERG M. D., HOULE S., 2005. *Proteinases as hormone-like signal messengers*. Swiss. Med. Wkly. 135, 425-432.
- HOULISTON R. A., KEOGH R. J., SUGDEN D., DUDHIA J., CARTER T. D., WHEELER-JONES C. P., 2002. *Protease-activated receptors upregulate cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells*. Thromb. Haemost. 88, 321-328.
- HUNTINGTON J. A., 2008. *How Na⁺ activates thrombin – a review of the functional and structural data*. Biol. Chem. 389, 1025-1035.
- KAWABATA A., KURODA R., 2000. *Protease-activated receptor (PAR), a novel family of G protein-coupled seven trans-membrane domain receptors: activation mechanisms and physiological roles*. Jpn. J. Pharmacol. 82, 171-174.
- KNOEPP L., BAGWELL C. D., GARLICH P., BROPHY C. M., 1999. *Thrombin contraction of vascular smooth muscle: implications for vasospasm*. Int. J. Surg. Invest. 1, 285-290.
- LANE D. A., PHILIPPOU H., HUNTINGTON J. A., 2005. *Directing thrombin*. Blood 106, 2605-2612.
- LAPETINA E. G., 1990. *The signal transduction induced by thrombin in human platelets*. FEBS Lett. 268, 400-404.
- LICARI L. G., KOVACIC J. P., 2009. *Thrombin physiology and pathophysiology*. J. Vet. Emerg. Crit Care (San. Antonio.) 19, 11-22.
- LUO W., WANG Y., REISER G., 2007. *Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection*. Brain Res. Rev. 56, 331-345.
- MACFARLANE S. R., SEATTER M. J., KANKE T., HUNTER G. D., PLEVIN R., 2001. *Proteinase-activated receptors*. Pharmacol. Rev. 53, 245-282.
- MACKIE E. J., PAGEL C. N., SMITH R., DE NIESE M. R., SONG S. J., PIKE R. N., 2002. *Protease-activated receptors: a means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals*. IUBMB. Life 53, 277-281.
- MARAGOUDAKIS M. E., TSOPANOGLIOU N. E., ANDRIOPOULOU P., MARAGOUDAKIS M. M., 2000. *Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression*. Matrix Biol. 19, 345-351.
- NATHAN C., XIE Q. W., 1994. *Regulation of biosynthesis of nitric oxide*. J. Biol. Chem. 269, 13725-13728.
- OFFERMANN S., 2006. *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ. Res. 99, 1293-1304.
- OLAS B., 2001. *Involvement of heterotrimeric G proteins in signal transduction in blood platelets*. Acta Haemat. Pol. 32, 393-405.
- OLAS B., WACHOWICZ B., 1998. *The role of thrombin in hemostasis*. Postępy Hig. Med. Dosw. 52, 471-487.
- OSSOVSKAYA V. S., BUNNETT N. W., 2004. *Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease*. Physiol Rev. 84, 579-621.
- PALATYŃSKA-ULATOWSKA A., MICHALSKA M., MICHALSKI Ł., PAWLICKA H., 2007. *Trombina i fibryna w procesach angiogenezy tkanek zębów i przyzębia – przegląd piśmiennictwa*. Dent. Med. Probl. 3, 307-313.
- PATTERSON C., STOUFFER G. A., MADAMANCHI N., RUNGE M. S., 2001. *New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology*. Circ. Res. 88, 987-997.
- RAMACHANDRAN R., HOLLENBERG M. D., 2008. *Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more*. Br. J. Pharmacol. 153, 263-282.
- SANNER M. F., 1999. *Python: a programming language for software integration and development*. J. Mol. Graph. Model. 17, 57-61.
- SAWICKA B., 2000. *Rozsiane wykrzepianie wewnętrznych naczyń: aspekty kliniczne, laboratoryjne i terapeutyczne*. Post. Nauk. Med. 3, 40-50.
- SCHMIDLIN F., BUNNETT N. W., 2001. *Protease-activated receptors: how proteases signal to cells*. Curr. Opin. Pharmacol. 1, 575-582.

- SHRIVASTAVA S., MCVEY J. H., DORLING A., 2007. *The interface between coagulation and immunity*. Am. J. Transplant. 7, 499–506.
- STEINBERG S. F., 2005. *The cardiovascular actions of protease-activated receptors*. Mol. Pharmacol. 67, 2–11.
- STEINHOFF M., BUDDENKOTTE J., SHPACOVITCH V., RAT-
TENHOLL A., MOORMANN C., VERGNOLLE N., LUGER
T. A., HOLLENBERG M. D., 2005. *Proteinase-acti-
vated receptors: transducers of proteinase-me-
diated signaling in inflammation and immune
response*. Endocr. Rev. 26, 1–43.
- STRUKOVA S. M., 2001. *Thrombin as a regulator of
inflammation and reparative processes in tiss-
ues*. Biochem. (Mosc.) 66, 8–18.
- SUO Z., CITRON B. A., FESTOFF B. W., 2004. *Throm-
bin: a potential proinflammatory mediator in
neurotrauma and neurodegenerative disorders*.
Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy 3, 105–114.
- TREJO J., 2003. *Protease-activated receptors: new
concepts in regulation of G protein-coupled re-
ceptor signaling and trafficking*. J. Pharmacol.
Exp. Ther. 307, 437–442.
- WEBER D. S., GRIENDLING K. K., 2004. *Thrombin: bey-
ond coagulation*. J. Mol. Cell Cardiol. 36, 13–15.
- WRIGHT J. H., MINOT G. R., 1917. *The Viscous Meta-
morphosis of the Blood Platelets*. J. Exp. Med.
26, 395–409.
- XI G., REISER G., KEEP R. F., 2003. *The role of throm-
bin and thrombin receptors in ischemic, hemor-
rhagic and traumatic brain injury: deleterious
or protective?* J. Neurochem. 84, 3–9.
- XIE W. Z., LEIBL M., CLARK M. R., DOHRMANN P., KUN-
ZE T., GIESELER F., 2005. *Activation of the coagu-
lation system in cancerogenesis and metastasa-
tion*. Biomed. Pharmacother. 59, 70–75.