

Nespecifične imunoreakcije na uropatogenu *E. coli*

**Alemka MARKOTIĆ, prof. dr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog**
**Tomislava SKUHALA, dr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog**
**Višnja ŠKERK, prof. dr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog**

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran
Mihaljević", Zagreb

Ključne riječi

UPEC
TLR4
PTX3
NK-stanice

Key words

UPEC
TLR4
PTX3
NK cells

Primljeno: 2014–11–06

Received: 2014–11–06

Prihvaćeno: 2014–12–18

Accepted: 2014–12–18

Pregledni rad

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) jedan su od najčešćih i najvažnijih zdravstvenih problema u žena reproduktivne dobi. Uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) odgovorna je za oko 90 % IMS. Osim mehanizama virulencije same UPEC, za razvoj bolesti odgovorni su i obrambeni imunološki mehanizmi o kojima se još uvijek zna vrlo malo. Iako nespecifične imunoreakcije obuhvaćaju brojne važne čimbenike, ovdje smo dali kratki prikaz imunoreakcija na UPEC, vezanih za receptore slične Tollu (TRL), pentraksin 3 (PTX3) i prirodno ubilačke (NK) stanice, za koje su se u zadnjih nekoliko godina u literaturi pojavili značajni znanstveni iskoraci koji bi u relativno skorom budućnosti mogli imati i značajnu praktičnu vrijednost u dijagnostici i liječenju bolesnika s infekcijama uzrokovanim UPEC-om.

Innate immune response to uropathogenic *Escherichia coli*

Review paper

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most common and most important health problems in women of reproductive age. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is responsible for about 90 % of the UTIs. In addition to the mechanisms of UPEC virulence itself, defensive immune mechanisms are responsible for the development of the disease as well, about which very little is known. Although innate immune reactions include a number of important factors, here we give a brief overview of immune reactions to UPEC, related to the Toll like receptors (TRL), pentraxin 3 (PTX3) and natural killer (NK) cells, for which, in recent years, significant scientific breakthroughs have been described in the literature, that in the relatively near future could have a significant practical value in diagnostics and treatment of patients with infections caused by UPEC.

Uvod

Infekcije mokraćnog sustava (IMS) jedan su od najčešćih i najvažnijih zdravstvenih problema u žena reproduktivne dobi. U oko 60 % svih žena razviti će se IMS jednom u životu. U prosjeku, 25 % tih žena će imati rekurentne IMS [1]. Uropatogena *Escherichia coli* (UPEC) je odgovorna za oko 90 % IMS i sposobna je migrirati iz crijeva i izazvati unutarstaničnu infekciju mokraćnog epitela, što može biti uzrokom rekurentnih IMS [2]. Osim mehanizama virulencije same UPEC, za razvoj bolesti odgovorni su i obrambeni imunološki mehanizmi o kojima se još uvijek zna vrlo malo. Ovaj rad će se fokusirati na neke novootkrivene mehanizme nespecifičnih imunoreakcija na UPEC.

Uropatogena *Escherichia coli* – faktori virulencije

Za bolje razumijevanje imunoreakcija na UPEC, potrebno je spomenuti i čimbenike virulencije. Danas poznajemo različite čimbenike virulencije za UPEC. Među važnima su geni koji kodiraju siderofore – molekule koje čine kompleksne spojeve s ionom željeza i na taj način omogućavaju njegovo korištenje od strane mikroorganizama. Tu je i gen za hemolizin koji ima sposobnost lize eritrocita i limfocita. Više je različitih čimbenika koji omogućavaju vezanje UPEC-a za epitelne stanice i sprječavanje njihovog ispiranja iz urotakta. Među važnijim čimbenicima su fimbrije tipa 1 koje su sposobne vezati se za nekoliko različitih receptora na stanicama kao što su:

uroplakin – transmembranski protein koji posreduje u staničnoj signalnoj transdukciji vezanoj uz aktivaciju, rast i pokretljivost stanica; CD11/CD18 integrini važni za adheziju leukocita u sklopu obrambenih mehanizama; CD44 – stanični glikoprotein uključen u međusobne interakcije stanica, adheziju i migraciju; CD48 antigen važan za aktivaciju i diferencijaciju različitih stanica imunološkog odgovora, te neke molekule ekstracelularnog matriksa. Fimbrije tipa 1 sudjeluju i u stvaranju biofilma. U čimbenike virulencije spadaju i fimbrijski (S/F1C, Pap, M hemaglutinin) i ne-fimbrijski adhezini [2–6]. Nakon vezanja UPEC invadira površinski sloj uroepitela, formirajući vrlo brzo biofilm u obliku unutarstanične bakterijske zajednice koja je uzrokom rezistencije na antibiotike, otpornosti na mehanizme nespecifične imunosti i predstavlja rezervoar rekurentnih uroinfekcija [2, 3, 5].

Receptori slični Tollu

Receptori slični Tollu (TLRs, od engl. *Toll-like receptors*) su ključne komponente prirodene imunosti i nalaze se na stanicama koje prezentiraju antigen, unutar stanične membrane ili endosoma. Njihova aktivacija dovodi do indukcije proupalnih citokina, te je važna karika u formiranju stečenih imunoreakcija [7]. Nekoliko različitih TLR-ova (TLR4, TLR5 i TLR11) je nađeno na površini epitelnih stanica mokraćnog mjehura i bubrega gdje su odgovorni za posredovanje u važnim imunoreakcijama. TLR4 je eksprimiran na epitelu mokraćnog mjehura i bubrega, dok TLR5 predominantno nalazimo na epitelu mokraćnog mjehura, a TLR11 na bubrežnom epitelu [8].

TLR4 predstavlja važan čimbenik u nespecifičnoj imunosti na UPEC-u. Na epitelnim stanicama urinarnog trakta nalazimo značajnu ekspresiju TLR4 i koreceptora CD14, koji su važni u procesu detekcije i vezanja bakterijskog lipopolisaharida (LPS). Kompleks TLR4/CD14 nakon vezanja s LPS-om UPEC-a pokreće signalni put koji vodi k aktivaciji nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B) i posljedičnoj produkciji citokina, uključujući interleukin (IL)-6 i IL-8. Ova dva citokina su među najvažnijim citokinima koje detektiramo u urinarnom traktu nakon bakterijske infekcije [8–9].

Osim ovog klasičnog puta, postoji i drugi paralelni signalni put u kojem povišenje unutarstaničnog cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) također dovodi do posljedično povećane brže ekspresije IL-6 i IL-8 u odnosu na opisani klasični put. Ovaj signalni put koji uključuje povišenje razine cAMP-a ima važnu ulogu kako u inhibiciji bakterijske invazije tako i u odstranjivanju unutarstaničnih UPEC [10]. Nakon vezanja fimbrija tip 1 s uroplakinom 1a dolazi do internalizacije UPEC-a i inkapsulacije u fuziformne vezikule. Fuziformne vezikule pri povećanju sadržaja mokraće u mjehuru, ali i pri povećanju unutarstaničnog cAMP-a putuju prema površini uroepitela,

povećavajući površinu mokraćnog mjehura. Kritičnu ulogu u fuziji fuziformnih vezikula i apikalne površine uroepitela ima povišenje cAMP-a, što može dovesti do odstranjivanja unutarstaničnog UPEC-a, a što predstavlja barem dijelom ulogu TLR4 u odstranjivanju unutarstaničnog UPEC-a [8–11]. U prilog važnosti TLR4 u nespecifičnoj imunosti na UPEC govori i podatak da mutacija TLR4 ili njegova smanjena ekspresija pogoduje nastanku perzistentne asimptomatske bakteriurije i rekurentnih uroinfekcija [8, 11]. Ovaj princip su u svom istraživanju pokušali iskoristiti Abraham SN i sur. za kombinirani imunomodulatorni/antibiotski terapijski pristup u liječenju infekcija UPEC-om pomoću forskolina. Forskolin je ekstrakt indijske biljke koji ima sposobnost povišenja unutarstaničnog cAMP-a, što može posljedično dovesti do odstranjivanja unutarstaničnih UPEC-a u mokraćni mjehur gdje bi onda djelovanjem antibiotika bakterije bile uništene [10].

TLR5 može imati kritičnu ulogu u razvoju ranih upalnih imunoreakcija na infekciju UPEC-om. Ligand za TLR5 je flagelin, a postoje neki podaci da UPEC može "isključiti" flagelarnu ekspresiju u mokraćnom mjehuru ili je "uključiti" u ureteru i bubrezima omogućavajući na taj način ascenziju prema bubrezima i izbjegavajući mehanizme nespecifične imunosti posredovane s TLR5 [8].

Za TLR11 je pokazano da ima ulogu u nespecifičnoj imunosti na uroinfekcije uzrokovane UPEC-om u miševa, ali nema pouzdanih podataka o njegovoj ekspresiji na uroepitelu u ljudi [8].

Osim ova tri TLR-a, pretpostavlja se da bi određenu ulogu u nespecifičnim imunoreakcijama na UPEC mogli imati i neki drugi TLR-i, za što za sada nema dovoljno podataka. U svakom slučaju ovo područje otvara značajne mogućnosti za imunomodulatorne pristupe u liječenju infekcija uzrokovanih UPEC-om te posljedično i uspješnije liječenje antibioticima osobito rekurentnih uroinfekcija.

Uloga pentraksina 3 u infekcijama urotrakta

Pentraksin 3 (PTX3) je član obitelji pentraksina. Brzo se oslobađa i proizvodi iz više različitih vrsta stanica: mononuklearni fagociti, dendritičke stanice, fibroblasti, endotelne stanice i neutrofili. Do njegove indukcije dolazi proupalnim signalima posredovanim TLR-om, IL-1 beta (β) i faktorom tumorske nekroze alfa (TNF- α). Ima svoju važnu ulogu u aktivaciji klasičnog puta komplementa, u komplementom posredovanom "čišćenju" apoptotičnih stanica te olakšava prepoznavanje patogena od strane makrofaga i dendritičkih stanica. Ubraja se u proteine akutne faze, u cirkulaciji ga nalazimo u koncentraciji od oko 25 ng/mL, a njegov brzi porast bilježi se u upali i infekciji: 6–8 h nakon indukcije. Dramatično povišenje (200–800 ng/mL) može se detektirati u endotoksičnom šoku, sepsi i drugim upalnim stanjima i infekcijama. U

većini bolesti pokazuje korelaciju s težinom kliničke slike, a predstavlja i značajan marker primarne lokalne inaktivacije nespecifične imunosti i upale [12–13].

Nedavno smo u našim istraživanjima [14] pokazali i njegovu važnu ulogu u rezistenciji na uroinfekcije uzrokovane UPEC-om na životinjskom modelu i u *ex vivo* istraživanju na ljudima. Jedna od važnih uloga PTX3 koja je pokazana u ovom istraživanju je opsonizacija bakterija koja ubrzava njihovu ingestiju i sazrijevanje fagosoma unutar neutrofila. Deficijencija PTX3 pokazuje nemogućnost rane kontrole infekcije zbog defektne fagocitoze te posljednično razvoja perzistentne upale.

Povišene vrijednosti PTX3 su nađene u serumu i urinu bolesnika s uroinfekcijama uzrokovanim UPEC-om, a korelirale su s težinom kliničke slike, što upućuje na mogućnost korištenja PTX3 kao važnog biomarkera u procjeni razvoja kliničke slike i ishoda bolesti. Ovome u prilog govori i dio istraživanja koji se odnosi na polimorfizam gena za PTX3 gdje je pokazana korelacija s osjetljivošću na razvoj pijelonefritisa i cistitisa uzrokovanih UPEC-om. Prikazano je i da su povišene vrijednosti PTX3 nađene i u bolesnika s cistitisom, kao i bolesnika s akutnim pijelonefritsom, dok se npr. serumske vrijednosti PTX3 u bolesnika s erizipelom nisu razlikovale od vrijednosti PTX3 u zdravih ispitanika [14].

Već smo prije spomenuli važnu signalnu ulogu TLR4 pri infekciji UPEC-om [9–11]. Naša istraživanja su pokazala da između ostalog, PTX3 proizvode uroepitelne stanice u sklopu aktivacije posredovane s TLR4 [14].

Naravno, postoji i kontinuirana potreba za uspostavljanjem ravnoteže između zaštitnih mehanizama posredovanih nespecifičnim imunoreakcijama i imunopatogenetskih oštećenja nastalih kao posljedica upalnih imunoreakcija. U miševa deficijentnih za PTX3 pored povišene osjetljivosti na infekciju UPEC-om, nađene su povišene vrijednosti kemokina te oštećenja tkiva uzrokovana infiltracijom neutrofilima [14]. Ova inicijalna istraživanja su pokazala da osim uloge u drugim važnim kliničkim entitetima, PTX3 ima iznimno važnu ulogu u kontroli infekcija uzrokovanih UPEC-om te predstavlja važan element u nespecifičnoj imunosti na UPEC, kao i poveznicu prema elementima specifične imunosti [14–15].

Prirudno ubilačke stanice i uropatogena *Escherichia coli*

Prirudno ubilačke stanice (NK-stanice od engl. *natural killer cells*) su važne stanice u sklopu nespecifične imunosti čiju funkciju vezujemo u pravilu uz imunoreakcije na viruse i tumore, a čine do 15 % stanica u okviru perifernih mononukleara u cirkulaciji [16–17]. Njihova uloga u bakterijskim infekcijama nije se dugo smatrala važnom i tek novija istraživanja pokazuju potencijalnu ulogu ovih sta-

nica u obrambenim mehanizmima u sklopu nespecifične imunosti na bakterijske infekcije. Tako se na primjer zadnjih godina sve više govori o ulozi NK-stanica u imunoreakcijama na *Mycobacterium tuberculosis*. Prema novijim spoznajama NK-stanice mogu direktno ubijati *M. tuberculosis* u humanim monocitima kroz produkciju interferona gama (IFN- γ). NK-stanice mogu specifično djelovati na inficirane makrofage, ali i direktno na mikobakterije preko različitih receptora, uključujući se tako direktno u prepoznavanje mikobakterija nakon ulaska u plućno tkivo te sudjelujući u generiranju imunoreakcija specifične imunosti [18–19].

Tako je i najnovije istraživanje grupe profesora O. Mandelboima pokazalo važnu ulogu NK-stanica u nespecifičnoj imunosti na UPEC [20]. Pokazano je tako da pojedini tipovi UPEC-a, kao što je UPEC CFT073 ubijaju NK-stanice. Pokazano je da su UPEC adherirale na NK-stanice u prvom redu putem fimbrija tipa 1 koristeći hemolizin A u procesu ubijanja NK-stanica. Štoviše, povećana adherencija preko fimbrija tipa 1 dovela je do povećanog ubijanja NK-stanica. S druge strane, u odsutnosti hemolizina A, NK-stanice su u prisutnosti UPEC lučile TNF- α i na taj način djelovale na sniženje broja bakterija u *in vitro* pokusima, ali i u mokraćnom mjehuru u ljudi. Važno je istaknuti da je u lučenju TNF- α dijelom ulogu imao i TLR-4, čija aktivacija je pokrenuta preko fimbrija tipa 1 i LPS-a. Jasno je pokazano da se nakon infekcije UPEC-om, NK-stanice nakupljaju u mokraćnom mjehuru, a nalazimo ih uglavnom u području uroepitela, osobito u mezenhimnom području. Ovo istraživanje je pokazalo važnu interakciju NK-stanica i UPEC-a gdje NK-stanice imaju sposobnost ubijanja UPEC-a putem TNF- α i posljednično kontrole uroinfekcije, a s druge strane razvoj mehanizama izbjegavanja spomenutih imunoreakcija lučenjem hemolizina A koji ubija NK-stanice. Ova istraživanja svakako otvaraju nove pristupe u razumijevanju nespecifične stanične imunosti u infekcijama UPEC-om [20].

Zaključak

Iako nespecifične imunoreakcije obuhvaćaju brojne važne čimbenike, ovdje smo htjeli dati kratki prikaz imunoreakcija na UPEC, vezanih za TLR, PTX3 i NK-stanice, za koje su se u zadnjih nekoliko godina u literaturi pojavili značajni znanstveni iskoraci koji bi u relativno skoroj budućnosti mogli imati i značajnu praktičnu vrijednost. Jedna od praktičnih vrijednosti je razvoj i/ili definiranje novih biomarkera za određivanje težine kliničke slike, te ishoda bolesti i uspješnosti liječenja u infekcijama uzrokovanim UPEC-om, gdje bi PTX3 mogao imati svoje značajno mjesto. Drugi vrlo značajan pristup, koji se može oslanjati i na istraživanja PTX3, a moguće još i više na mehanizme vezane uz TLR4, je i razvoj imunomodulatora i njihov utjecaj na uspješnost antibiotskog liječenja u infekcijama UPEC-om. U tom području za očekivati su nova

znanstvena dostignuća sa značajnom praktičnom primjenom.

Literatura

- [1] Škerk V, Škerk V, Jakšić J, i sur. Research of urinary tract infections in family medicine physicians' offices—empiric antimicrobial therapy of urinary tract infections-Croatian experience. *Coll Antropol.* 2009; 33: 625–31.
- [2] Hannan TJ, Totsika M, Mansfield KJ, Moore KH, Schembri MA, Hultgren SJ. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev.* 2012; 36: 616–48.
- [3] Dhakal BK, Kulesus RR, Mulvey MA. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38 Suppl 2: 2–11.
- [4] Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int.* 2009; 75: 1153–65.
- [5] Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16: 100–7.
- [6] Krajinović LC, Šoprek S, Korva M i sur. Serum levels of metalloproteinases and their inhibitors during infection with pathogens having integrin receptor-mediated cellular entry. *Scand J Infect Dis.* 2012; 44: 663–9.
- [7] Akira S, Takeda K. Toll-like receptors signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499–511.
- [8] Song J, Abraham SN. TLR-mediated immune responses in the urinary tract. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11: 66–73.
- [9] Song J, Duncan MJ, Li G, Chan C i sur. A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2007; 3: e60.
- [10] Bishop BL, Duncan MJ, Song J, Li G, Zaas D, Abraham SN. Cyclic AMP regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat Med.* 2007; 13: 625–30.
- [11] Song J, Bishop BL, Li G, Grady R, Stapleton A, Abraham SN. TLR4 mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 14966–71.
- [12] Mantovani A, Valentino S, Gentile S, Inforzato A, Bottazzi B, Garlanda C. The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1285: 1–14.
- [13] Jaillon S, Bonavita E, Gentile S i sur. The long pentraxin PTX3 as a key component of humoral innate immunity and a candidate diagnostic for inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014; 165: 165–78.
- [14] Jaillon S, Moalli F, Ragnarsdottir B i sur. The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection. *Immunity.* 2014; 40: 621–32.
- [15] Miao Y, Abraham SN. Peeing pentraxins. *Immunity.* 2014; 40: 460–2.
- [16] Romero I, Garrido F, Garcia-Lora AM. Metastases in immune-mediated dormancy: a new opportunity for targeting cancer. *Cancer Res.* 2014; 74: 6750–7.
- [17] Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature.* 2015 Jan; 517: 293–301.
- [18] Bozzano F, Marras F, De Maria A. Immunology of tuberculosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014; 6: e2014027.
- [19] Lu CC, Wu TS, Hsu YJ i sur. NK cells kill mycobacteria directly by releasing perforin and granulysin. *J Leukoc Biol.* 2014; 96: 1119–29.
- [20] Gur C, Copenhagen-Glazer S, Rosenberg S i sur. Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic *E. coli* is counteracted by bacterial hemolysinA-dependent killing of NK cells. *Cell Host Microbe.* 2013; 14: 664–74.