

Imunita na sliznicích se zřetelem na sliznici urogenitálního traktu a diabetes

J. Krejsek, M. Kudlová, M. Kolářková, J. Novosad

Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a FN Hradec Králové, přednosta prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Souhrn: Nemocní s diabetes mellitus mají často narušenou slizniční imunitu v močových cestách. Slizniční imunita močových cest má v porovnání s jinými kompartmenty sliznic unikátní charakteristiky, jako je např. absence fyziologické mikroflóry či absence hlenu. Patogenní mikroorganismy jsou zde identifikovány prostřednictvím receptorů PRR, které jsou exprimovány na epitelových buňkách i buňkách imunitního systému. Zánětová reakce je charakterizována akumulací neutrofilních granulocytů. Průběh zánětové reakce je určován do značné míry polymorfizmy v genech kódujících receptory PRR.

Klíčová slova: diabetes mellitus – slizniční imunita – močové cesty – infekce

Mucosal immunity with emphasise on urinary tract immunity and diabetes

Summary: Protective immune response in urinary tract is frequently impaired in patients with diabetes. Immunity in this mucosal compartment displays unique characteristics; e.g. absence of physiological microflora and lack of mucus. Pathogens are identified by the PRR receptors expressed on both epithelial and immune cells. Inflammatory response characterised by the accumulation of granulocytes is followed. Both protective and harm characteristics of inflammatory response are inseparably linked and delineated by gene polymorphisms in PRR receptors.

Key words: diabetes mellitus – mucosal immunity – urinary tract – infection

Přirozené obranné bariéry

Infekce močových cest jsou velmi běžnou komplikací u nemocných, kteří trpí diabetes mellitus. Důvody pro zvýšenou vnímavost nemocných s diabetes mellitus k infekcím močových cest jsou několikery. Z úzkého pohledu vztahu mezi makroorganizmem a infekčním agens je třeba pomýšlet na poruchy v lokální i systémové imunitě, které jsou u nemocných s diabetes mellitus nacházeny. Úlohu sehrávají nepochybně i imunobiologické vlastnosti konkrétních infekčních agens [1].

V našich úvahách musíme vyjít z odlišností slizniční imunity v kompartmentu močových cest. Je třeba konstatovat, že převážná většina informací týkajících se slizniční imunity je získávána studiem slizničního imunitního systému v trávicím traktu. Poznatky z tohoto slizničního kompartmentu jsou obtížně přenositelné do jiných kompartmentů. Slizniční imu-

nitní systém močových cest se odlišuje již v otázce tzv. fyziologických bariér, kterými rozumíme protektivní mechanismy neimunní povahy. První výraznou odlišností sliznice močových cest je za fyziologických podmínek její sterilita. To je v příkrém kontrastu k situaci ve většině úseků trávicí trubice, zvláště sliznice tlustého střeva. Střevní fyziologická mikroflóra vytváří složité strukturované společenství – tzv. osidlovací vzory, které již svou pouhou přítomností představují výrazný obranný faktor. Kompetují totiž s patogenními mikroorganismy o prostor i živiny. Navíc poskytují výrazné stimulační a diferenciací podněty epitelové výstelce, a tak zesilují tzv. bariérovou rezistenci. Sliznice močových cest neobsahuje na svém povrchu složité cukerné struktury, které na jiných slizničních površích vytvářejí hlen či glykokalyx. Chybí zde tedy podstatná část fyziologických obranných bariér. Přítomnost hlenu

totiž znemožňuje či znesnadňuje adherenci patogenních mikroorganismů a umožňuje snazší očistu. Na rozdíl od jiných slizničních kompartmentů nemá urotel schopnost očisty zajišťované např. řasinkovým epitelem dýchacích cest. Stejně jako jinde představují i zde podstatnou část uvedených obranných prvků imunitního původu sekreční protilátky třídy IgA. Nemáme zatím informace, jaké efektorové B-lymfocyty produkující IgA do sliznice močových cest migrují a jaké je indukční místo pro tyto B-lymfocyty. Za významný obranný faktor v močových cestách je nutné považovat samotnou moč. Proud moči, která se fyziologicky tvoří jako sterilní, představuje očistu pro sliznici močových cest. V tomto ohledu je kritické jak množství tvořené moči, tak vlastní proces močení. Obě okolnosti mohou být u nemocných trpících diabetes mellitus narušeny a ochranné vlastnosti moči jsou

v tomto ohledu ztráceny. Samotná moč v sobě obsahuje látky s antibakteriálními účinky. Příkladem může být lysozym, který je schopen rozkládat stěny gram-pozitivních bakterií. Vedle tohoto klasického obranného faktoru jsou v moči v dostatečné míře přítomny peptidy s antibakteriálními účinky, např. defenziny. Tyto složky přirozené obrany představují významnou hráz vůči pronikání patogenních mikroorganismů [2]. V úvahách nad uvedenými obrannými faktory nacházejícími se v moči nesmíme zapomenout na tzv. Tamm-Horsfallův protein. Tato bílkovina, která je tvořena v ledvinách v Henleově klíčku, je nejabundantnějším proteinem v lidské moči. Až donedávna nebyla rozeznána její úloha v obranných reakcích. V současné době je jasné doloženo, že Tamm-Horsfallův protein má schopnost vázat se v sacharidové struktury patogenních mikroorganismů infikujících močové cesty, a bránit tak jejich adhezenci a penetraci. O imunomodulačních vlastnostech tohoto proteinu bude pojednáno později.

Nebezpečné vzory a rozvoj zánětové reakce

Pro pochopení fyziologie i patofyziologie obranné odpovědi na sliznicích močových cest je vhodné zahrnout novější poznatky o schopnosti složek přirozené imunity, ale také např. epitelových buněk identifikovat tzv. „nebezpečné vzory“. Tato koncepce vychází z již dobře doložených poznatků jak v experimentálních modelech, tak v klinických situacích. Především buněčné složky přirozené imunity, tj. makrofágy a dendritické buňky, ale spolu s nimi také aktivované epitelové či endotelové buňky, exprimují na svém povrchu soubory signálních molekul, označovaných jako molekuly PRR (Pattern Recognition Receptors). Receptory PRR jsou identifikovány „nebezpečné vzory“ exogenního (např. mikrobiálního) nebo endogenního původu. Identifikace „nebezpečných vzorů“ vede k aktivaci nitrobuněčných signálních drah. Mezi nimi je zřejmě nejvý-

znamnější signální dráha NFκB. Aktivovaný transkripční faktor NFκB je translokován do jádra buňky a stimuluje zde vazbou na regulační sekvence přepis mnohých genů, které jsou odpovědné za produkci prozánětových mediátorů a aktivaci buňky [3].

„Nebezpečné vzory“ patogenních mikroorganismů se nazývají PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Pronikající patogenní mikroorganismy jsou identifikovány jako „nebezpečné vzory“ jak dendritickými buňkami, které vysílají svoje výběžky mezi epitelovými buňkami až na lumenální stranu epitelu, tak receptorů PRR, které se nacházejí na epitelových buňkách. Po identifikaci těchto „signálů nebezpečí“ jsou na sliznici močových cest vytvářeny podmínky pro rozvoj zánětové reakce. Pro stručnost můžeme zmínit pouze aktivitu signální molekuly TLR-4. Prostřednictvím TLR-4 je identifikována přítomnost mikrobiálního LPS. V jiných buňkách, např. v monocytových elementech, je signální dráha TLR-4 aktivována pouze v přítomnosti dalších membránových molekul, např. CD14. Molekula CD14 není na povrchu uroepitelu vyjádřena. Přesto je zřejmé, že signalizace prostřednictvím TLR-4 je v tomto slizničním kompartmentu funkční. Bylo to prokázáno v in vitro pokusech, které využívaly buněčné linie odvozené od epitelových buněk močových cest. Do rozvoje zánětové odpovědi na sliznici močových cest je zapojena ještě molekula TLR-2. Ta identifikuje přítomnost lipoproteinů a lipoteichoové kyseliny především gram-pozitivních mikroorganismů. Signální molekuly z rodiny receptorů TLR neomezují svoje aktivity pouze na „nebezpečné vzory“ mikrobiálního původu. Jsou schopny identifikovat rovněž endogenní „nebezpečné vzory“, představované např. přítomností hyaluronové kyseliny, heparansulfátu, fibrinogenu, či produkty pokročilé glykozylace [4]. Endogenní „nebezpečné vzory“ jsou identifikovány prostřednictvím TLR-4, ale i dalších rodin receptorů PRR. Přesto lze pozorovat, že

slizniční buňky močových cest mají nižší schopnost odpovídat na přítomnost bakteriálních lipopolysacharidů. Souvisí to pravděpodobně s relativně běžnou přítomností takovýchto mikroorganismů. Přemrštěná odpověď na jejich přítomnost by vytvářela nefyziologické prozánětové aktivity vedoucí k poškození makroorganismu. Právě v zajištění dostatečných prozánětových podmínek může sehrávat úlohu již zmiňovaný Tamm-Horsfallův protein. Svou schopností vázat se na složité cukerné struktury mikroorganismů může zvyšovat citlivost receptoru TLR-4, a vytvářet tak podmínky pro rozvoj obranné zánětové reakce [5].

Zánět jako výsledek reakce močových cest na infekci

Identifikace „signálů nebezpečí“ zajišťují, že jsou lokálně produkovány prozánětové působky, především pluripotentní prozánětové cytokiny a chemokiny, které regulují usměrněný pohyb různých buněčných populací. Následně dochází k aktivaci a migraci neutrofilních granulocytů. Neutrofilní granulocyty jsou hlavními efektorovými buňkami, které zajišťují buněčnou složku obrany na sliznicích. K jejich akumulaci dochází prostřednictvím diapedézy. Nezbytnou podmínkou pro úspěšný vstup granulocytů z cévního řečiště je aktivace endotelových buněk prostřednictvím prozánětových cytokinů, např. TNFα. Za jejich usměrněný pohyb jsou odpovědné jak exogenní chemoatraktivní látky bakteriálního původu (např. N-formylované bakteriální oligopeptidy), tak endogenní chemoatraktanta. Z nich klíčové postavení patří IL-8. Jeho působením spolu s působením chemoatraktivních štěpů vznikajících v průběhu aktivace komplementového systému, např. C5a, se na sliznicích močových cest v přítomnosti patogenních mikroorganismů akumuluje neutrofilní granulocyty a dostávají se i do moči. Vlastní antimikrobiální působení neutrofilních granulocytů je obecně známo. Stručně shrneme, že zahrnuje působení antimikrobiálních

peptidů (defenziny). V důsledku aktivace NADPH oxidázového systému jsou vytvářeny vysoce reaktivní mikrobicidní působky [6].

Kontakt sliznice dolních močových cest s mikroorganismy je běžný. Z těchto důvodů musí být obranná reakce na sliznicích regulována tak, aby k ní docházelo skutečně pouze za přítomnosti patogenních mikroorganismů. K tomu slouží výše uvedené mechanismy identifikace „nebezpečných vzorů“ patogenních mikroorganismů. Na straně druhé patogenní mikroorganismus má své zvláštní charakteristiky, kterými se odlišuje od nepatogenních mikroorganismů nebo podmínečně patogenních kmenů. Cílem je, aby k obranné zánětové reakci docházelo skutečně za okolností, kdy je taková reakce nezbytná.

Patogenní mikroorganismy lze charakterizovat na základě jejich imunobiologických vlastností. Z molekulárně genetického pohledu obsahují ve svém genomu zvláštní úseky, kde jsou nahromaděny geny kódující faktory patogenity. Tyto tzv. ostrovy patogenity jsou přítomny u patogenních mikroorganismů a chybějí u nepatogenních mikroorganismů. Patogenní mikroorganismy jsou odpovědné za rozvoj zánětové odpovědi, uvolnění poškozených epitelových buněk, apoptózu či nekrózu epitelových buněk a za schopnost invadovat. Modelovými mikroorganismy pro studium infekce močových cest jsou uropatogenní kmeny *Escherichia coli*. Patogenní *Escherichia coli* jsou vybaveny pily I. typu, kterými adherují prostřednictvím manosylovaných proteinů na epitelové struktury hostitele. Další významnou povrchovou strukturou odpovědnou za adheenci uropatogenních *Escherichia coli* jsou P-fimbrie. Receptory pro P-fimbrie na povrchu hostitelských buněk jsou složité glykosfingolipidy, které jsou ve vysoké míře exprimovány na epitelových buňkách sliznice močových cest. Po jejich vazbě je stimulována tvorba sfingomyelinázy, odpovědná za tvorbu ceramidu. Ceramid slouží pravdě-

podobně jako signální meziprodukt, který moduluje identifikaci „nebezpečných vzorů“ prostřednictvím TLR-4 [7,8].

Po vazbě uropatogenních kmenů *Escherichia coli* na epitelové buňky urotelu je zahájena internalizace mikroorganismů, která je aktivním procesem vyžadujícím remodelaci cytoskeletálních struktur. Důsledkem takovýchto změn je oddělování povrchových epitelových buněk, na kterých jsou adherovány patogenní mikroorganismy. Tuto událost je zapotřebí rozpoznat jako významný obranný faktor.

Důvodů pro zvýšenou vnímavost nemocných trpících diabetes mellitus k infekci močových cest je nepochybně mnoho. Omezíme se pouze na některé z nich. Problémem může být již samotné složení moči nemocných s diabetes mellitus 1. typu. Podíl látek s antimikrobiálními vlastnostmi může být snížen. Velmi pravděpodobně sehraává úlohu i suboptimální mechanická očista zprostředkovaná močí. Zatím není nic známo o úloze polymorfismu genů kódujících receptory rodiny TLR. U dětí trpících vyšší frekvencí infekcí močových cest byla prokázána přítomnost TLR-4 se substitucí Asp na pozici aminokyseliny 299 za Gly. Tato izoforma TLR-4 je spojena se zvýšenou vnímavostí ke gram-negativním infekcím močových cest. Je nepochybné, že diabetes mellitus, ať 1. či 2. typu, je svou vlastní povahou určován genovými polymorfismy. Je tedy velmi pravděpodobné, že i imunitní reaktivita u těchto nemocných je takto podmíněna [9].

Zvýšenou vnímavost k infekcím močových cest lze však už nyní u nemocných s diabetes vysvětlit defekty ve funkcích neutrofilních granulocytů, které představují hlavní efektorový mechanismus obrany. Zde paradoxně dochází ke zvýšené adhezi neutrofilů k endotelovým buňkám, která není korelována s hladinou HbA_{1c}. Takto adherované neutrofilní granulocyty mohou zřejmě přispívat k poškození endotelových výstelky. Prostup neutrofilů

přes endotelové výstelky je však u nemocných s diabetem omezen. Zde byl zjištěn negativní vztah ke koncentraci produktů pokročilé glykozylace. Opakovaně prokázána je snížená schopnost neutrofilních granulocytů nemocných s diabetem migrovat usměrněným pohybem. Narušená chemotaxe je zřetelná zvláště u nemocných s koncentrací glukózy vyšší než 12 mmol/l. Podobný defekt je nalézán i pro monocytové buňky. Naopak euglykemie normalizuje usměrněný pohyb neutrofilů. Na rozdíl od starších prací současné údaje nepoukazují na sníženou schopnost neutrofilů nemocných s diabetes mellitus pohlcovat mikroorganismy. Různé defekty jsou však zjišťovány v nitrobuňčné schopnosti usmrčovovat pohlcené mikroorganismy. Zde lze doložit vliv inzulínu na funkce neutrofilů. Aktivita NADPH-oxidázy negativně koreluje s glykemií. Jsou k dispozici i vysvětlení tohoto jevu na molekulové úrovni.

Negativně ovlivněna je i specifická imunita nemocných s diabetes mellitus. Zdůrazňována je především snížená aktivita buňkami zprostředkované imunity. V protilátkové imunitě je spekulováno o možnosti, že glykozylace protilátek může interferovat s jejich biologickými aktivitami.

Závěr

V současnosti nahlížíme na imunitní reakci jako na tělní reakci, která v sobě vedle protektivní složky imanentně nese také jistou míru poškození i v průběhu fyziologické odpovědi. Poškození tkání může převýšit protektivní účinky imunitní reakce v případě patofyziologické zánětové reakce. Takto se otvírají nové pohledy na vztah mezi hostitelem a mikroorganismy právě s ohledem na individuální imunitní reaktivitu. Studie ukázaly, že existují děti se sklonem k rozvoji pyelonefritidy, kterou reagují přehnanou, nepřiměřenou zánětovou reakcí, ve které převažují prvky poškozující nad protektivními, na přítomnost patogenních mikroorganismů. Experimenty na zvířecích mo-

delech jasně ukazují, že omezení pro-zánětvých podnětů, např. vyřazením některého z klíčových genů odpovědného za rozvoj zánětové reakce, je protektivní, třebaže nevede k eliminaci infekce. Např. myši, které mají mutaci v TLR-4, rozvíjejí asymptomatický nosičský stav, který připomíná asymptomatickou bakteriurii u lidí. Je tedy ve hře i otázka, zda poškození spojené s působením patogenních mikroorganismů na sliznici močového ústrojí s diabetes mellitus může být přinejmenším z části způsobeno i vlastní obrannou reakcí makroorganismu [10].

Literatura

1. Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 3–13.
2. Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 147–151.
3. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1–14.
4. Lin L. RAGE on the toll road? *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 351–358.
5. Säemann MD, Weichhart T, Hörl WH et al. Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 227–235.
6. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 813–823.
7. Svanborg C, Bergsten G, Fischer H et al. Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 33–39.
8. Zhang D, Zhang G, Hayden MS et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522–1526.
9. Karoly E, Fekete A, Banki NF et al. Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children. *Pediatr Res* 2007; 61: 371–374.
10. Sirard JC, Bayardo M, Didierlaurent A. Pathogen-specific TLR signaling in mucosa: mutual contribution of microbial TLR agonists and virulence factors. *Eur J Immunol* 2006; 36: 260–263.

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

www.fnhk.cz

e-mail: krejsek@fnhk.cz

Doručeno do redakce: 23. 5. 2007

www.kardiologickeforum.cz