

Peter Veranič<sup>1</sup>

## Uropatogena *Escherichia coli* – priložnostni znotrajcelični parazit

*Uropathogenic Escherichia coli* –  
*an Opportunistic Intracellular Parasite*

---

### IZVLEČEK

---

**KLJUČNE BESEDE:** urotelij – patologija – patologija, cistitis, *Escherichia coli*

Večino okužb sečil povzročajo bakterije iz skupine sevov uropatogenih *Escherichia coli*. Značilnost okužbe sečil je pogosto ponavljanje okužbe, ki jo večinoma povzroči isti sev bakterij, kot je povzročil prvotno okužbo. Nedavna odkritja so pokazala, da je poglaviti razlog ponavljanja okužb obstoj bakterij, ki se po prvi akutni okužbi naselijo v epitelnih celicah sečnega mehurja (urotelijske celice), kjer preidejo v mirujočo fazo znotraj endocitotskih veziklov. V notranosti urotelijskih celic so bakterije zaščitene pred imunskim sistemom organizma in pred delovanjem mnogih antibiotikov. Nova so tudi spoznanja o življenjskem krogu uropatogene *Escherichia coli*, ki večinoma poteka znotraj končno diferenciranih urotelijskih celic. Kot kaže, so za uspešno namnoževanje uropatogene *Escherichia coli* pomembne ultrastrukturne značilnosti diferenciranih urotelijskih celic, predvsem odsotnost aktinskih filamentov v subapikalnem predelu celic. Uropatogena *Escherichia coli* gostiteljsko celico zapusti predvsem zaradi vstopanja v druge še neokužene celice. Odkritje znotrajceličnega dela življenjskega kroga uropatogene *Escherichia coli* nam odpira možnosti za odkrivanje novih, uspešnejših načinov zdravljenja kroničnega cistitisa.

---

### ABSTRACT

---

**KEY WORDS:** bladder urothelium – pathology, cystitis, *Escherichia coli*

The majority of urinary tract infections are caused by strains of uropathogenic *Escherichia coli*. One of the characteristics of urinary tract infections is the high frequency of recurrence, usually caused by the same bacterial line causing the primary infection. The results of a recent study revealed that the reason for recurrent infection lies in residual bacteria that persist in latent form inside uroepithelial cells after the acute primary infection. In the endosomal vesicles of urothelial cells, uropathogenic *Escherichia coli* is thus protected from both the immune system and most antibiotics. It has also been found recently that uropathogenic *Escherichia coli* spends most of its lifetime inside terminally differentiated urothelial cells. The most important factors of successful proliferation of uropathogenic *Escherichia coli* were found to be the ultrastructural characteristics of these differentiated cells, such as the disappearance of actin filaments from the subapical region of urothelial cells. Uropathogenic *Escherichia coli* seems to exit urothelial cells only to be disseminated to other uninfected cells. The recent discovery of uropathogenic *Escherichia coli* as an intracellular parasite indicates new treatment modalities for recurrent cystitis.

---

<sup>1</sup> Doc. dr. Peter Veranič, univ. dipl. biol., Inštitut za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Lipičeva 2, 1000 Ljubljana.

## UVOD

Uroinfekcije so druga najpogostejša oblika infekcij pri človeku; pogostejše so le še okužbe dihalnih poti (1). Ženske so bolj podvržene tej okužbi, verjetno zaradi krajše razdalje med danko, osnovnim virom okužbe, in sečnico, ki je najpogostejše vstopno mesto za uropatogene bakterije. Po sečnici lahko bakterije prodrejo do sečnega mehurja in povzročajo cistitis. Od tam pa se okužba lahko razširi po sečevodih do ledvic, kar povzroči mnogo težje obolenje – pielonefritis. Urinarni sistem ima učinkovito zaščito pred okužbo predvsem s tokom urina, ki spirata celotno urinarno pot in tako odplakne večino vstopajočih bakterij. Bakterije, ki dospajo do sečnega mehurja in se pritrdijo na epitelne celice, so izpostavljene napadom protiteles iz skupine IgA in polimorfonuklearnih levkocitov. Dodatno se mehur brani pred napadom bakterij z luščenjem okuženih epitelnih celic, ki se skupaj z bakterijami odstranijo z urinom (2). Kljub tej zaščiti doleti okužba urinarnega trakta več kot 50 % žensk vsaj enkrat v življenju in pri več kot 25 % žensk, ki so doživele akuten cistitis, se ta v šestih mesecih spet ponovi (3).

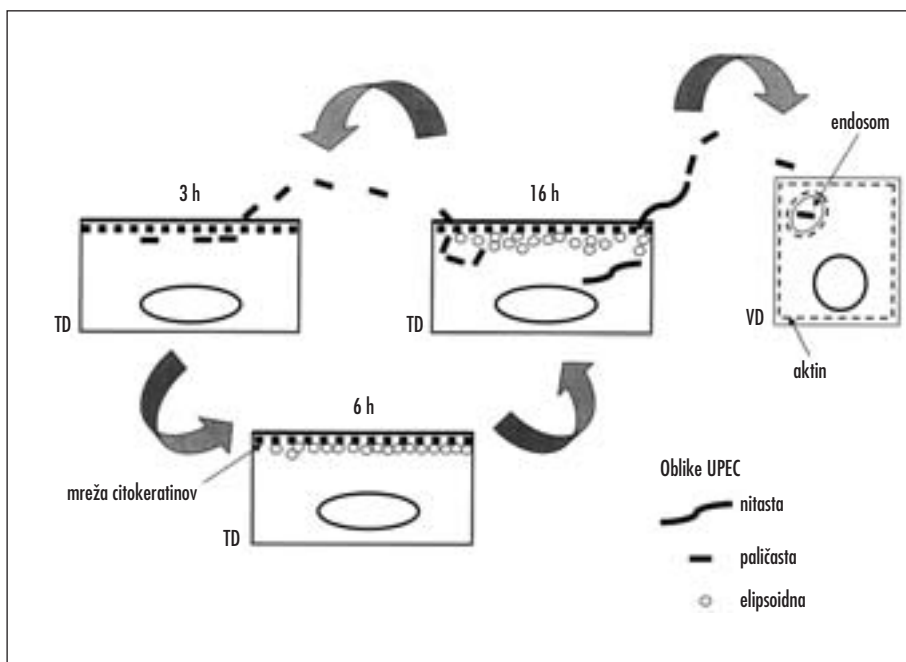
## POVZROČITELJI UROINFEKCIJ

Glavnino okužb urinarnega trakta povzročajo bakterije iz skupine uropatogene *Escherichia coli* (UPEC). To bakterijo se uvršča med zunajcelične patogene, ki so se sposobni pritrditi na epitelne celice, ne pa tudi vstopiti in preživeti znotraj evkariontske celice (2). Dvom v pravilnost te predpostavke poraja dejstvo, da skoraj 70 % ponovnih okužb povzročijo isti sev UPEC, ki so ga dokazali pri primarni okužbi (4). Ob tem je znano, da je v posameznikovem prebavnem traktu kot primarnem viru okužbe dokaj velika pestrost sevov *Escherichia coli* (5). Iz tega lahko sklepamo, da ostanejo bakterije v urinarnem traktu v pritajeni obliki tudi po prenehanju znakov okužbe. To domnevo so že sredi 80. let prejšnjega stoletja podkrepili raziskovalci Bishopove skupine (6), ki so v biopsijskih vzorcih mehurja žensk s kroničnim cistitisom dokazali prisotnost bakterij, čeprav v urinu bakterij niso našli. Dejansko je ta raziskava pokazala, da ostane po cistitisu kolonija UPEC znotraj urotelijskih celic kot prikrita okužba. Novej-

še študije na mišjem modelu cistitisa so pokazale, da je vstop UPEC v urotelijsko celico bistven dogodek za pojav akutne urotelijske okužbe. Te bakterije lahko preživijo več mesecev znotraj urotelijskih celic, kjer so zaščitene pred imunskim sistemom in antibiotiki, v zanje ugodnih razmerah pa povzročijo ponovno okužbo (7, 8).

## RAZVOJNE FAZE UPEC

Na mišjem modelu cistitisa so ugotovili, da UPEC med okužbo mehurja prehaja skozi štiri razvojne faze (slika 1) (9). V prvih 3 urah po okužbi se bakterije pritrdijo na površinsko urotelijsko celico in prerinejo skozi apikalno membrano ter tam pričnejo oblikovati znotrajcelično bakterijsko združbo (angl. *intracellular bacterial community* – IBC). V tej **prvi fazi** so bakterije paličaste oblike, velike okrog 3  $\mu\text{m}$ . Za to fazo so značilne hitre delitve, na 30 do 35 minut, kar v kratkem času močno poveča IBC. Po 6 do 8 urah govorimo o **drugi fazi**, ko nastanejo urejeni skupki tesno zapakiranih bakterij, ki izpolnjujejo večji del citoplazme površinske urotelijske celice. Takrat so bakterijske celice manjše (0,7  $\mu\text{m}$ ), elipsoidne oblike in delitve se upočasnijo. **Tretja faza** nastopi od 12 do 16 ur po okužbi, ko se pričnejo posamezne bakterije ločevati iz teh urejenih skupkov. Postanejo hitro gibljive in ponovno dobijo paličasto obliko. Te gibljive bakterije se prerinejo iz površinskih urotelijskih celic in se pojavijo v svetlini mehurja, kjer lahko okužijo druge urotelijske celice ter tako vstopijo v ponovni krog namnoževanja v gostiteljskih celicah. Intenzivno izstopanje bakterij iz urotelijske celice sproži prekinjanje medceličnih stikov, kar vodi v odlučenje celice in odstranitev bakterij, ki se nahajajo v ali na celi. Hitrost odziva urotelija z luščenjem okuženih celic se spreminja od gostitelja do gostitelja in od tega je odvisna hitrost odstranitve bakterij iz mehurja. Nekatero od bakterij v teh ponavljajočih se cikih namnoževanja zrastejo in dobijo nekaj 10  $\mu\text{m}$  dolgo nitasto obliko, ki predstavlja **četrto fazo** razvoja bakterije. Nitaste bakterije so zaradi svoje za bakterije nenavadne dolžine varne pred napadi polimorfonuklearnih levkocitov, ki pričnejo nekako 6 ur po okužbi intenzivno odstranjevati bakterije iz sečnega mehurja. Te nitaste



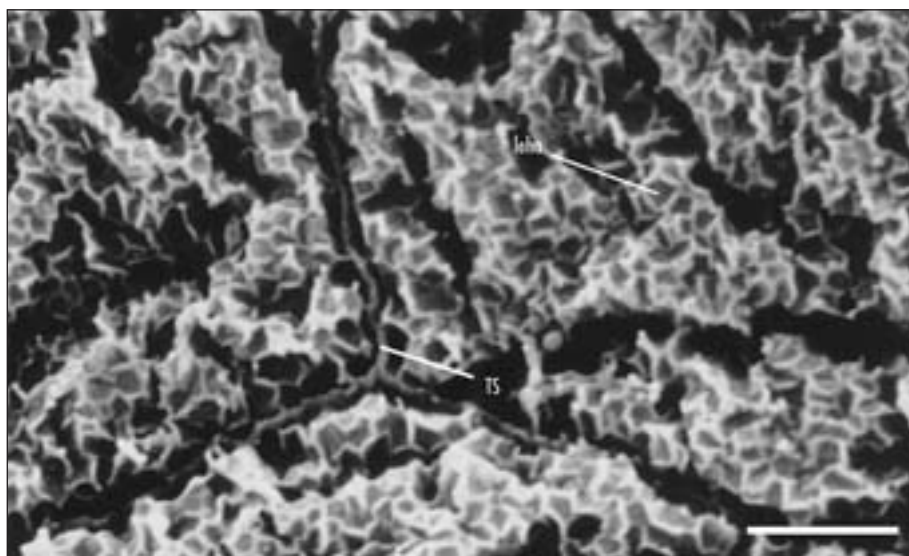
Slika 1. Življenjski krog UPEC.

bakterije so verjetno glavni vir bakterij, ki se po zaključeni akutni fazi odcepljajo iz nitaste bakterijske celice in se vrinejo v še neokužene urotelijske celice. Zaradi odluščenja okuženih končno diferenciranih celic se na površini urotelija izpostavijo celice na nižji diferenciacijski stopnji. V teh manj diferenciranih celicah se UPEC ne razmnožujejo, pač pa preidejo v mirujočo fazo. Ultrastrukturne spremembe med diferenciacijo površinskih celic sodijo med pglavitne dejavnike, ki omogočijo ponovne intenzivne delitve bakterij iz znotrajceličnih rezervoarjev, kar lahko povzroči nov izbruh bolezni (7).

UPEC paličaste oblike vstopijo v končno diferencirano urotelijsko celico (TD). Po pritrditvi na citokeratinsko mrežo dobijo elipsoidno obliko in se močno namnožijo. Nekatere od UPEC dobijo ponovno paličasto obliko in postanejo gibljive. Zapustijo gostiteljsko celico in okužijo nove celice. Po nekaj dneh se pojavijo dolge nitaste UPEC, iz katerih se odcepljajo bakterije, ki vdrejo v celice na vmesni stopnji diferenciacije (VD).

## ZA OKUŽBO Z UPEC POMEMBNE DIFERENCIACIJSKE SPREMEMBE UROTELIJSKIH CELIC

UPEC so se prilagodile na življenje znotraj dveh diferenciacijskih stopenj urotelijskih celic. Proliferativno aktivne so v končno diferenciranih, tako imenovanih dežnikastih celicah, ki v zdravem mehurju prekrivajo površino sečnega mehurja. Glavna značilnost dežnikastih celic je močno odebeljena apikalna membrana. Sestavljajo jo membranske domene (lehe) iz kristalno urejenih proteinov uroplakinov, ki prispevajo k manjši prepustnosti membrane za sestavine urina (slika 2) (10). Posebnost dežnikastih celic je še odsotnost aktina v subapikalnem delu celic (11). V tem področju se nahaja 1  $\mu\text{m}$  debela plast citokeratinov, ki jo prebadajo vzporedno potekajoči tuneli, potrebni za komunikacijo med plazmalemo in notranjostjo celice (slika 3) (12). To mrežno strukturo imenujemo trajektorijska mreža. Po odluščenju dežnikastih celic se na površini urotelija pojavijo manj

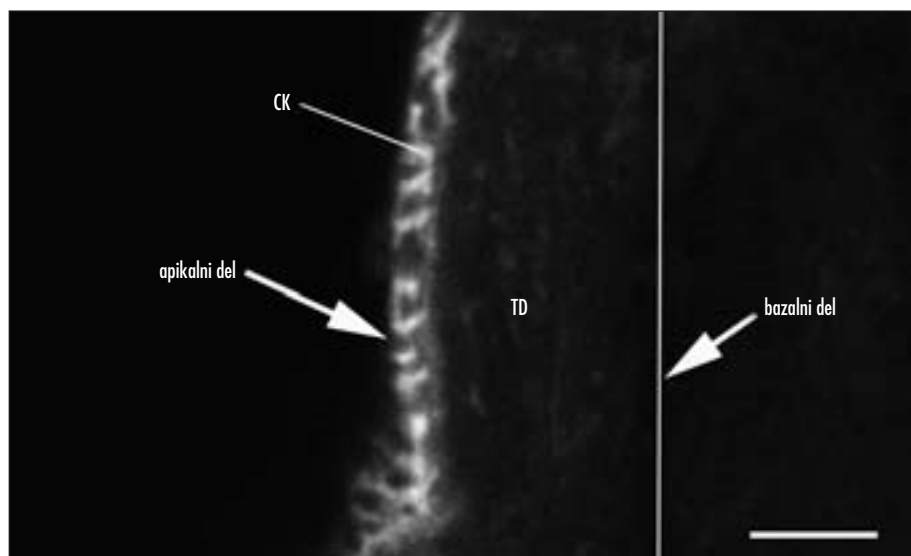


Slika 2. Apikalno površino končno diferenciranih celic prekrivajo lehe iz uroplakinov. Mejo med celicami nakazuje greben, kjer se nahaja tesni stik (TS). Merilna črtica = 3  $\mu$ m.

diferencirane celice, v katere prav tako lahko vstopijo UPEC. Za manj diferencirane površinske celice urotelija je značilna odsotnost uroplakinskih domen na apikalni plazmale-

mi in prisotnost mikrovilov. Pod apikalno plazmalemo se v teh celicah nahaja debela plast aktina, ni pa še oblikovana trajektorijska mreža citokeratinov.

254



Slika 3. Na apikalnem delu končno diferencirane urotelijske celice (TD) je v prečnem prerezu vidna trajektorijska zgradba citokeratinske mreže (CK). Merilna črtica = 5  $\mu$ m.

## PRITRDITEV UPEC NA UROTELIJSKO CELICO

Ključnega pomena za uspešnost okužbe je pritrnitev bakterije na apikalno membrano urotelijskih celic (8). Pri tem sodelujejo proteini iz družine adhezinov. To so proteini zunanje membrane UPEC. Lahko so sestavina izrastkov, imenovanih pili, ali pa so nameščeni difuzno po membrani. Med adhezine, pomembne za pritrnanje UPEC na urotelijske celice, sodi FimH, ki se nahaja na vrhu pilusa tipa-1. Ugotovljeno je bilo, da se FimH veže na manozo uroplakina 1a (13). Uroplakini so v diferenciranih površinskih urotelijskih celicah urejeni v heksagonalne komplekse, ki sestavljajo membranske domene apikalne plazmaleme. Visokoločljivostna elektronska mikroskopija je pokazala, da se pilus UPEC usidra v središčno odprtino med heksagonalno urejene uroplakine, kar omogoča trdno vezavo bakterije na urotelijsko celico.

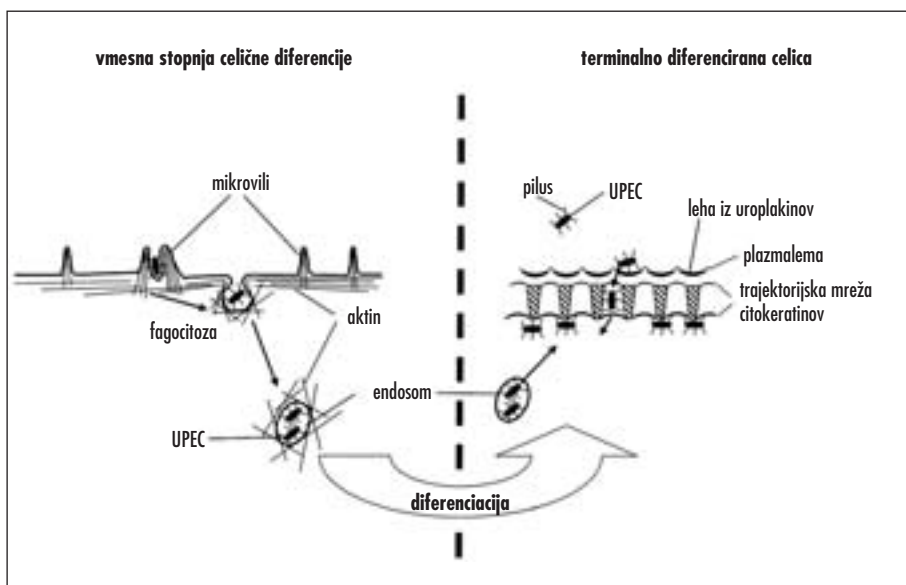
## VSTOP UPEC V UROTELIJSKO CELICO

Pritrditvi na apikalno membrano urotelijske celice sledi vstopanje bakterije v epitelijsko celico. Način vstopanja je še vedno predmet

raziskav. Dosedanje raziskave na *in vitro* modelih, kjer so bile celice na nizki stopnji diferenciacije, kažejo, da poteka vstopanje s posebno obliko fagocitoze (8). UPEC z nekaterimi adhezini (Afa/Dr) vzpodbudijo nastanek mikrovilom podobnih izrastkov, ki obdajo bakterijo in omogočijo njeno vključitev v celico (slika 4). V manj diferenciranih celicah ostanejo bakterije obdane z membrano endocitotske vakuole in se v njej ne razmnožujejo, temveč ostanejo v latentni fazi (14). Vstop v končno diferencirano celico je očitno drugačen, saj te celice na apikalni strani nimajo aktina, zato fagocitoza ni mogoča (11). Kot kažejo ultrastrukturne analize vrstične elektronske mikroskopije, se bakterije po pritrditvi na uroplakin prerinejo v citoplazmo skozi apikalno membrano in direktno vstopijo v citosol celice, kjer se pričnejo intenzivno deliti (2, 7).

## VPLIV CITOSKELETA NA PROLIFERACIJO UPEC

Izkazalo se je, da predvsem razporeditev citoskeleta v urotelijski celici določa, ali bo UPEC vstopila v proliferacijski cikel ali bo prešla v mirujočo fazo (slika 4). Proliferativna faza



Slika 4. UPEC v različno diferenciranih urotelijskih celicah.

se odvija le v končno diferenciranih urotelijskih celicah. UPEC lahko vstopijo tudi v manj diferencirane celice vmesne plasti urotelija, vendar se v njih ne razmnožujejo, pač pa ostanejo v latentni fazi. Bistvenega pomena za razliko v proliferativni aktivnosti UPEC v celicah vmesne plasti in površinske plasti je razlika v prisotnosti in razporeditvi aktinskega citoskeleta, ki nastopi med diferenciacijo. Med diferenciacijo se v dežnikastih celicah razgradi večina aktina, predvsem v apikalnem delu celic. S poskusi *in vitro* so pokazali, da aktin zavira proliferativno aktivnost UPEC in jih vzdržuje v latentni fazi. S porušitvijo aktinskih filamentov v okuženih urotelijskih celicah na nizki stopnji diferenciacije se je namreč proliferativna aktivnost UPEC močno povečala. Bakterije, ki so bile do tedaj vključene v endosomski vakuolarni sistem, so se po razgradnji aktinskih filamentov sprostile v citosol (7). Za UPEC pomemben element citoskeleta so tudi citokeratini, kot kaže, so pritrditveno mesto za te bakterije. V diferenciranih celicah se ob trajektorijski mreži citokeratinov nabere glavna bakterij. Urejanje bakterij v organizirane skupke je verjetno posledica ploskovne ureditve citokeratinov, ob katerih se bakterije uredijo v plastovito skladovnico (7, 12, 14).

Po odlučanju končno diferenciranih celic lahko UPEC s fagocitozo vstopijo v izpostavljene celice, ki so na vmesni stopnji diferenciacije. V procesu diferenciacije se zaradi razgradnje aktina iz endosoma sprostijo UPEC in se pripenjo na citokeratinsko mrežo. Nove UPEC se iz lumna mehurja prerinejo skozi plazmalemo in se prav tako pritrldijo na citokeratinsko mrežo.

## POTENCIALNE NOVE MOŽNOSTI ZDRAVLJENJA UROINFEKTOV

Znotrajcelična narava UPEC in prisotnost rezidualnih bakterij znotraj celic je vzpodbudila razmišljanje o novih strategijah zdravljenja okužb sečnih poti. Novejše raziskave so

usmerjene v preverjanje uspešnosti zdravljenja s kombinacijo antibiotikov in hkratnega odstranjevanja znotrajceličnih rezervoarjev bakterij. Načeloma naj bi takšno zdravljenje zmanjšalo pogostost ponovnih okužb urinarnega trakta. Ena takšnih metod je zdravljenje s kombinacijo antibiotikov in forskulina, ki s povišanjem nivoja cAMP v celicah poveča eksocitozo in tako omogoči hitrejšo odstranjevanje bakterij iz celice. V svetlini mehurja pa se bakterije izpostavijo vplivu antibiotikov, ki sicer ne učinkujejo na bakterije v notranjosti urotelijskih celic. Še vedno pa po tej metodi ostanejo v urotelijskih celicah bakterije, ki jim je uspelo prodreti v citosol celic in jih z eksocitozo ne moremo odstraniti iz celic (15, 16).

Druga, verjetno uspešnejša metoda odstranjevanja bakterij iz sečnega mehurja, bi bila kombinacija antibiotika z biopolimerom hitozanom. Prednost tega polimera je, da je sposoben vezati nase bakterije (17), ki se nahajajo v svetlini mehurja, obenem pa povzroča luščenje celic, ki so v neposrednem stiku s hitozanom (18). S to metodo bi lahko odstranili tudi tiste bakterije, na katere zaradi zaščitenosti znotraj urotelijskih celic antibiotiki ne učinkujejo. Izredna regenerativna sposobnost urotelija omogoča hitro nadomeščanje odluščenih celic urotelija in ponovno vzpostavitev njegove barierne vloge. Vendar ima tudi ta metoda pomanjkljivosti, saj moramo hitozan dodajati direktno v mehur s katetrom ali punkcijo nad sramnično zrastjo, kar je za pacienta dokaj neprijetno (19).

## ZAKLJUČEK

Nedavno odkritje, da so uropatogene bakterije tudi znotrajcelični paraziti, odpira področje, na katerem bi predvsem interdisciplinarni pristop bazičnih in kliničnih raziskovalnih skupin omogočil uspešnejše zdravljenje te pogoste in ponavljajoče se infekcijske bolezni, za katero zbolijo vsaka druga ženska in ki samo v Združenih državah Amerike povzroči 1,6 milijard dolarjev stroškov letno.

## LITERATURA

1. Eto DS, Jones TA, Sundsbak JL, et al. Integrin-Mediated Host Cell Invasion by Type 1-Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 2007; 3: 949–61.
2. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, et al. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1998; 282 (5393): 1494–7.
3. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, et al. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* 2000; 10 (8): 509–15.
4. Russo TA, Stapleton A, Wenderoth S, et al. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis* 1995; 172 (2): 440–5.
5. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308 (5728): 1635–8.
6. Elliott TS, Reed L, Slack RC, et al. Bacteriology and ultrastructure of the bladder in patients with urinary tract infections. *J Infect* 1985; 11 (3): 191–9.
7. Eto DS, Sundsbak JL, Mulvey MA. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2006; 8 (4): 704–17.
8. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, et al. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 2000; 19 (12): 2803–12.
9. Justice SS, Hung C, Theriot JA, et al. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 (5): 1333–8.
10. Hu P, Meyers S, Liang FX, et al. Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283 (6): F1200–7.
11. Romih R, Veranic P, Jezernik K. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochem Cell Biol* 1999; 112 (5): 375–80.
12. Veranic P, Jezernik K. Trajectory organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; 53 (4): 317–25.
13. Zhou G, Mo WJ, Sebbel P, et al. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from *in vitro* FimH binding. *J Cell Sci* 2001; 114: 4095–103.
14. Bower JM, Eto DS, Mulvey MA. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* 2005; 6 (1): 18–31.
15. Eto DS, Mulvey MA. Flushing bacteria out of the bladder. *Nat Med* 2007; 13 (5): 531–2.
16. Bishop BL, Duncan MJ, Song J, et al. Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat Med* 2007; 13 (5): 625–30.
17. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. *J Pharmacy and Pharmacology* 2001; 53 (8): 1047–67.
18. Kos MK, Bogataj M, Veranic P, et al. Permeability of pig urinary bladder wall: time and concentration dependent effect of chitosan. *Biol Pharm Bull* 2006; 29 (8): 1685–91.
19. Levart KT, Kenda RB. Okužba sečil pri dojenčkih in majhnih otrocih. *Med razgl* 2005; 44: 299–313.

Prispelo 23. 1. 2008