

Received: 2006.10.09
Accepted: 2007.02.06
Published: 2007.02.19

Właściwości immunologiczne Gram-ujemnych pałeczek *Pseudomonas aeruginosa*

Immunological properties of the Gram-negative bacilli *Pseudomonas aeruginosa*

Jolanta Rusiecka-Ziółkowska, Małgorzata Fleischer, Jolanta Staroszczyk

Katedra i Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Pseudomonas aeruginosa powszechnie obecna w środowisku, jest przyczyną zakażeń oportunistycznych u pacjentów z zaburzeniami w układzie immunologicznym, ciężkimi oparzeniami oraz z mukowiscydozą. Właściwości chorobotwórcze są warunkowane przez substancje powiązane z komórką oraz wydzielane na zewnątrz. Substancje te mogą stymulować wytwarzanie prozapalnych cytokin, które mogą się przyczyniać do rozwoju stanu zapalnego. W artykule przedstawiono rolę *P. aeruginosa* w zakażeniach różnych tkanek. Na podstawie współczesnej literatury autorzy charakteryzują antygeny i toksyny bakteryjne oraz ich zdolność do wytwarzania cytokin.

Słowa kluczowe:

Pseudomonas aeruginosa • stymulacja • cytokiny

Summary

Pseudomonas aeruginosa, which is commonly present in the environment, causes opportunistic infections in immunocompromised patients as well as in those with severe burns or cystic fibrosis. Its pathogenic properties are connected with both intracellular and extracellular constituents. They are able to stimulate the production of proinflammatory cytokines contributing to the development of inflammation. The paper presents the role of *Pseudomonas aeruginosa* in the infection of various tissues. The authors describe bacterial antigens, toxins, and their ability to induce cytokine production on the basis of the contemporary literature.

Key words:

Pseudomonas aeruginosa • stimulation • cytokines

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10122.pdf

Word count:

1631

Tables:

–

Figures:

–

References:

25

Adres autorki:

dr nauk med. Jolanta Rusiecka-Ziółkowska, Katedra i Zakład Mikrobiologii AM we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; e-mail: joda@mbio.am.wroc.pl

Pseudomonas aeruginosa jest oportunistycznym, zewnątrzkomórkowym patogenem powszechnie obecnym w środowisku. Drobnoustroj ten może wywoływać zakażenia o ciężkim i ostrym przebiegu u pacjentów z obniżoną odpornością, rozległymi oparzeniami, chorobami nowotworowymi, a przewlekłe zapalenia płuc u pacjentów z mukowiscydozą. Właściwości chorobotwórcze *P. aeruginosa* warunkują liczne powiązane z komórką lub wydzielane pozakomórkowe substancje, w tym: otoczka alginianowa, adhezyny, hemolizyny, proteazy, enterotoksyna, egzotoksyna S i A oraz lipopolisacharyd (LPS). Największe znaczenie w chorobotwórczości *P. aeruginosa* przypisuje się egzotoksynie A, która jest uważana za najważniejszą z toksyn u tego gatunku. Mechanizm jej działania jest podobny do działania toksyny błoniczej i polega na hamowaniu syntezy białek.

Egzotoksyna A, elastaza i proteaza alkaliczna były wykrywane w płwocinie u chorych z mukowiscydozą, a w okresach zaostrzeń choroby obserwowano wzrost ich stężenia [12], co może wskazywać na ich udział w zaburzeniu funkcji komórek nabłonka dróg oddechowych. Zakażenia dotyczą częściej tkanki, w której doszło już do uszkodzenia komórek nabłonka. Uszkodzone komórki wykazują zwiększoną ekspresję receptorów adhezyn i asjaloganglozydu 1 (aGM1), co ułatwia przyleganie bakterii do komórek nabłonkowych i uszkodzonych rzęsek [22].

Pałeczki *P. aeruginosa* są również często odpowiedzialne za zapalenia rogówki u osób noszących soczewki kontaktowe, a także za niezwiązane ze stosowaniem soczewek stany zapalne rogówki u osób osłabionych i wyniszczonych oraz zakażenia rogówki powstałe po urazach [8].

Zakażenia wywołane przez *P. aeruginosa* mają zazwyczaj gwałtowny przebieg z naciekiem tkanki łącznej i wysiękiem śluzowo-ropnym. Za wiele zjawisk związanych z rozwojem zakażenia odpowiadają białka efektorowe systemu III sekrecji. System ten polega na wydzielaniu białka przez przylegający do komórek gospodarza drobnoustroj bezpośrednio do ich cytoplazmy. W tym systemie wydzielane są cztery białka efektorowe: Exo S, Exo T, Exo U i Exo Y. Białka te mogą powodować śmierć komórek biorących udział w procesie fagocytozy lub jej zahamowanie [22].

1. UDZIAŁ CYTOKIN W ROZWOJU PROCESU ZAPALNEGO W ORGANIZMIE

Reakcją organizmu na rozwijającą się infekcję jest miejscowa i ogólnoustrojowa odpowiedź związana z wytwarzaniem wielu cytokin prozapalnych przez komórki układu immunologicznego oraz tkanki objęte procesem zapalnym. Cytokiny wydzielane głównie przez monocyty/makrofagi powodują uruchomienie odpowiedzi immunologicznej, aktywację i interakcje komórek immunologicznie kompetentnych. Są one również wydzielane przez inne komórki organizmu: keratynocyty, fibroblasty, komórki śródbłonka naczyń, nabłonka rogówki, naczyńówki [8,9]. Cytokiny są rozpuszczalnymi peptydami i niskocząsteczkowymi glikoproteinami o działaniu plejotropowym, oddziałując na różne typy komórek pełniących różne funkcje oraz wzajemnie na siebie. Poprzez to oddziaływanie tworzą tzw. sieć cytokinową, regulując miejscową i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną i zapalną. Zaburzenie równowagi w sieci cytokinowej może być przyczyną rozwoju niektó-

rych chorób, a następnie ich nawrotów. Reakcje z udziałem cytokin mogą się odbywać na poziomie tej samej komórki (autokrynne), między komórkami sąsiadującymi, za pośrednictwem dyfuzji w substancji międzykomórkowej (parakrynne) lub między komórkami oddalonymi od siebie (endokrynne). Działanie cytokin odbywa się za pomocą swoistych receptorów obecnych na komórkach docelowych. Każdy receptor zawiera trzy struktury: domenę zewnątrzkomórkową łączącą się z cytokiną, przezbłonową przekazującą sygnał do wnętrza komórki i fragment wewnątrzkomórkowy, przez który pobudzenie dociera do wnętrza komórki. Oprócz receptorów umiejscowionych w błonach komórkowych, istnieją tzw. receptory rozpuszczalne, niezwiązane z komórką, która je wytwarza. Łącząc się z cytokiną blokują jej interakcję z receptorem komórkowym.

Substancjami stymulującymi wydzielanie cytokin są endotoksyny i inne antygeny bakteryjne, antygeny wirusowe, a także same cytokiny, interleukina 1, czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor TNF). *Pseudomonas aeruginosa* składa się z licznych komórkowych i pozakomórkowych składników, które w różnym stopniu stymulują wydzielanie TNF-alfa z monocytów i makrofagów. Właściwości takie ma lipopolisacharyd (LPS), poryny, picyjanina, egzotoksyna A i egzoenzymy S, T, U, Y. Najwięcej informacji uzyskano dzięki badaniom dotyczącym reakcji zapalnej w odpowiedzi na działanie LPS Gram-ujemnych pałeczek. LPS jest uznawany za silny stymulator aktywujący komórki układu immunologicznego o działaniu plejotropowym. Pełni on główną rolę w patogenezie wstrząsu septycznego [1]. Wykazano, że w zakażeniach ostrych spowodowanych przez *P. aeruginosa* LPS występuje w postaci „gładkiej”, czyli zawiera swoisty łańcuch polisacharydowy, natomiast w przewlekłych w zmienionej postaci, „szorstkiej”, bez łańcuchów O-swoistych [7]. Stymulacja za pomocą LPS leukocytów i komórek nabłonkowych powoduje wydzielanie cytokin, głównie TNF-alfa, interleukiny 1 (IL-1) oraz innych czynników procesu zapalnego.

2. CHARAKTERYSTYKA WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOLOGICZNYCH SUBSTANCJI WYDZIELANYCH NA ZEWNĄTRZ I ZWIĄZANYCH Z KOMÓRKĄ BAKTERYJNĄ

O zdolności substancji bakteryjnych do stymulacji i wydzielania przez komórki organizmu mediatorów reakcji zapalnej i immunologicznej, mimo szeroko zakrojonych badań eksperymentalnych, jak dotąd niewiele wiadomo. Badania prowadzone nad LPS uzyskanym ze ściany komórkowej *P. aeruginosa* wykazały, że ma on słabsze właściwości toksyczne i w mniejszym stopniu indukuje cytokinę niż LPS *Burkholderia cepacia* czy bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, takich jak *Escherichia coli* i *Salmonella spp.* [6,16,25]. LPS łączy się z komórkami docelowymi za pomocą receptorów umiejscowionych na ich powierzchni (receptor CD14 monocytów i neutrofilów). Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych blokujących receptor powoduje zahamowanie wytwarzania TNF-alfa [25], nie zapobiega jednak całkowicie rozwojowi odpowiedzi zapalnej, co przemawia za udziałem w jej powstawaniu także innych czynników.

Egzotoksyna S (egzoenzym S) jest toksyną działającą wewnątrzkomórkowo (wywołuje efekt cytotoksyczny) oraz zewnątrzkomórkowo (reaguje z receptorami na komórkach doce-

lowych). Jest wytwarzana przez szczepy izolowane od chorych z zapaleniem płuc oraz z mukowiscydozą. Egzotoksyna S stymuluje makrofagi pęcherzyków płucnych do wytwarzania cytokin prozapalnych i chemokin, które powodują nagromadzenie granulocytów obojętnochłonnych w tkance objętej procesem zapalnym. Zwiększone stężenie egzotoksyny, które koreluje z rozległością uszkodzenia tkanki płucnej wykazano w badaniach prowadzonych na modelach zwierzęcych oraz u chorych z mukowiscydozą [13,24]. Podanie dotchawicze egzozymu S szczurom powoduje masywne nagromadzenie granulocytów obojętnochłonnych w tkance płucnej, a obraz histopatologiczny jest zbliżony do zmian w płucach chorych z mukowiscydozą i infekcją wywołaną przez *P. aeruginosa*. Zmniejszenie liczby makrofagów powoduje obniżenie syntezy cytokin i napływu granulocytów. Dodatkowo, uszkodzenie tkanki płucnej wywołują enzymy uwalniane z makrofagów i neutrofilów [5]. Prowadzone są również badania nad udziałem egzotoksyny S w patogenezie wstrząsu septycznego i zdolnością do indukcji syntezy cytokin prozapalnych w trakcie rozwoju wstrząsu. Egzotoksyna S ma właściwości charakteryzujące superantygeny, chociaż nie jest do nich zaliczana. Wzbudza aktywację limfocytów T, syntezę cytokin niezależną od limfocytów T. W porównaniu z superantygenami egzotoksyna słabiej indukuje syntezę cytokin. Wykazano, że egzozym S pobudza wytwarzanie TNF-alfa i interleukiny 8 (IL-8), które są wydzielane w postaci aktywnych biologicznie substancji [5]. Wykazano również, że indukuje transkrypcję prozapalnych cytokin IL-6 i TNF-alfa w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells – PBMC) [4]. Wydzielane cytokiny pochodziły głównie z monocytów aktywowanych bezpośrednio przez egzotoksynę S, w sposób niezależny od limfocytów T.

Wiele uwagi poświęcono również badaniom dotyczącym egzotoksyny A. Dobrze znane są właściwości cytotoxiczne tego białka, natomiast w niedostatecznym stopniu poznana jest zdolność egzotoksyny A do stymulacji cytokin oraz jej wpływ na komórki układu immunologicznego. Badania wykazały, że egzotoksyna A hamuje syntezę interferonu gamma (IFN-gamma) przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) oraz ekspresję CD80, CD86, ICAM-1, HLA-DR na monocytach, a także ogranicza cytotoxiczną aktywność komórek NK. Supresji komórek NK nie udało się znieść nawet przez cytokiny zwiększające ich aktywność, takie jak IL-2, IFN-alfa i TNF-alfa. Michalkiewicz i współpracownicy stwierdzili, że egzotoksyna A zastosowana w dawce 100 ng/ml zmniejsza syntezę IFN-gamma o około 30%. Sugerują oni, że może to być wynikiem bezpośredniego hamowania syntezy lub pośrednio przez wpływ na cząsteczki uczestniczące w przekazywaniu sygnałów między komórkami [17]. Egzotoksyna A wykazuje również *in vitro* zdolność do hamowania wytwarzania TNF przez makrofagi pęcherzyków płucnych stymulowane przez LPS, w znacznym stopniu zmniejsza ekspresję CD14 i CD11c/CD18 na powierzchni tych komórek. Wykazano również, że podanie dożylnie egzotoksyny A i LPS powodowało większe wytwarzanie TNF w surowicy myszy niż podanie samego LPS [10]. Doświadczenia z dotchawiczym podaniem u myszy LPS, proteazy alkalicznej i elastazy wykazały wzrost procentowego udziału neutrofilów w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych [11]. Inni autorzy donoszą o hamowaniu proliferacji limfocytów przez egzotoksynę A oraz zmniejszeniu wytwarzania niektórych cytokin, takich jak TNF,

IFN-gamma czy IL-1 [20]. Wykazano również, że egzotoksyna A może powodować apoptozę mastocytów ludzkich [12]. Różnorodność otrzymanych wyników wskazuje na konieczność prowadzenia dalszych badań, niemniej nie ulega wątpliwości, że toksyna ta odgrywa zasadniczą rolę w modulacji układu odpornościowego i rozwoju zakażenia w organizmie gospodarza.

Badania glikoproteiny powierzchniowej tworzącej otoczkę śluzową obecną zwłaszcza u szczepów *P. aeruginosa*, które wywołują stan zapalny płuc u chorych z mukowiscydozą wykazały, że ma ona działanie mitogennie na ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej oraz mysie limfocyty B. Podanie przeciwciał blokujących glikoproteinę chroni myszy przed śmiercią [3]. Glikoproteina *P. aeruginosa*, w przeciwieństwie do LPS ma silne właściwości stymulujące wytwarzanie TNF-alfa. Regulacja wytwarzania odbywa się na poziomie transkrypcji czynnika NF-κB i białka aktywującego 1 (AP-1) [14]. Zewnątrzkomórkowy alginian łączy się także z przeciwciałami opsonizującymi hamując fagocytozę bakterii, co utrudnia eradykację i wydłuża czas trwania zakażenia [19].

Enzymy wydzielane przez *P. aeruginosa*, w tym elastaza i proteaza alkaliczna oprócz destrukcji tkanek mogą również oddziaływać immunomodulująco. Fosfataza alkaliczna inaktywuje białka, przeciwciała, komplement odgrywające ważną rolę w obronie organizmu, natomiast elastaza przeprowadza reakcję hydrolizy wiązań peptydowych białka A i D surfaktantu, które uczestniczą w odporności wrodzonej [15,23].

P. aeruginosa wydziela różnorodne barwniki, m.in. piocyjaninę (N-metylo-1-hydroksyfenazyna). Barwnik ten wykrywany w płwocinie chorych na mukowiscydozę, uszkadza rzęsiki nabłonka dróg oddechowych. Wykazano, że piocyjaniina zwiększa wydzielanie IL-8 przez ludzkie komórki nabłonka dróg oddechowych, czego następstwem jest zwiększona koncentracja neutrofilów w zapaleniach płuc wywołanych przez *P. aeruginosa* [2]. Wykazano, że jest czynnikiem powodującym apoptozę neutrofilów tym samym sprzyja rozwojowi przewlekłego procesu zapalnego [22]. Poza tym piocyjaniina hamuje również proliferację komórek T pośrednio przez spadek wytwarzania interleukiny 2 (IL-2) i ekspresji receptora IL-2 na powierzchni komórek T [18].

P. aeruginosa jest drobnoustrojem wydzielającym wiele egzotoksyn i enzymów, które są odpowiedzialne za rozwój zakażenia, zwłaszcza u pacjentów z zaburzeniami układu immunologicznego. Liczne prowadzone badania eksperymentalne dowodzą, że substancje te mogą wpływać na odpowiedź immunologiczną, zarówno swoistą jak i nieswoistą oraz ją modyfikować poprzez stymulację czynników zapalnych w postaci cytokin. Różnorodność doniesień i wyników wskazuje na to, że mechanizmy patogenetyczne wywołanych zaburzeń są poznane w niewielkim stopniu. Ponadto bardzo ważne są wzajemne interakcje zachodzące między tkankami organizmu, wydzielanymi toksynami i cytokinami. Wyniki otrzymane *in vitro* mogą się różnić od tych, które przebiegają *in vivo*, ponieważ nie znamy wszystkich substancji mających wpływ na przebieg reakcji w żywym organizmie. Wymaga to dalszych szerokich, interdyscyplinarnych badań, które przyczynią się do wyjaśnienia tych mechanizmów, a w przyszłości stworzyć nowe możliwości terapeutyczne opanowania zakażeń wywołanych przez *P. aeruginosa* oraz inne drobnoustroje.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Caille V, Bossi P, Grimaldi D, Vieillard-Baro A.: Physiopathology of severe sepsis. *Presse Med.*, 2004; 33: 256-261
- [2] Denning G.M., Wollenweber L.A., Railsback M.A., Cox C.D., Stoll L.L., Britigan B.E.: *Pseudomonas pyocyanin* increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1998; 66: 5777-5784
- [3] Dimitracopoulos G., Bartell P.F.: Slime glycolipoproteins and the pathogenicity of various strains of *Pseudomonas aeruginosa* in experimental infection. *Infect. Immun.*, 1980; 30: 402-408
- [4] Epelman S., Bruno T.F., Neely G.G., Woods D.E., Mody C.H.: *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S induces transcriptional expression of proinflammatory cytokines and chemokines. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 4811-4814
- [5] Epelman S., Neely G.G., Ma L.L., Gjomarkaj M., Pace E., Melis M., Woods D.E., Mody C.H.: Distinct fates of monocytes and T cells directly activated by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J. Leukoc. Biol.*, 2002; 71: 458-468
- [6] Ernst R.K., Yi E.C., Gou L., Lim K.B., Burns J.L., Hackett M., Miller S.I.: Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science.*, 1999; 286: 1561-1565
- [7] Goldberg J.B., Pler G.B.: *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends Microbiol.*, 1996; 4: 490-494
- [8] Hazlett L.D.: Corneal response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2004; 23: 1-30
- [9] Henderson B., Wilson M., Wren B.: Are bacterial exotoxins cytokine network regulators? *Trends Microbiol.*, 1997; 5: 454-458
- [10] Hirakata Y., Furuya N., Tateda K., Kaku M., Yamaguchi K.: *In vivo* production of exotoxin A and its role in endogenous *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Infect. Immun.*, 1993; 61: 2468-2473
- [11] Hirakata Y., Kirikae T., Kirikae F., Yamaguchi T., Izumikawa K., Takemura H., Maesaki S., Tomono K., Yamada Y., Kamihira S., Nakano M., Kitamura S., Kohno S.: Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on endotoxin-induced tumour necrosis factor production in murine lung. *J. Med. Microbiol.*, 1999; 48: 471-477
- [12] Jenkins C.E., Swiatonowski A., Issekutz A.C., Lin T.J.: *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induced human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 37201-37207
- [13] Kudoh I., Wiener-Kronish J.P., Hashimoto S., Pittel J.P., Frank D.W.: Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *Am. J. Physiol.*, 1994; 267: L551-L556
- [14] Lagoumintzis G., Christofidou M., Dimitracopoulos G., Paliogianni F.: *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 4614-4622
- [15] Mariencheck W.I., Alcorn J.F., Palmer S.M., Wright J.R.: *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003; 28: 528-537
- [16] Mathiak G., Kabir K., Keller H., Steinringer E., Minor T., Rangger C., Neville L.F.: Lipopolysaccharides from different bacterial sources elicit disparate cytokine responses in whole blood assays. *Int. J. Mol. Med.*, 2003; 11: 41-44
- [17] Michalkiewicz J., Stachowski J., Barth C., Patzer J., Dzierżanowska D., Madaliński K.: Effect of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on IFN-gamma synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. *Immunol. Lett.*, 1999; 69: 359-366
- [18] Nutman J., Berger M., Chase P.A., Dearborn D.G., Miller K.M., Waller R.L., Sorensen R.U.: Studies on the mechanism of T cell inhibition by the *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigment pyocyanine. *J. Immunol.*, 1987; 138: 3481-3487
- [19] Sensacovic J.W., Bartell P.F.: The slime of *Pseudomonas aeruginosa*: biological characterization and possible role in experimental infection. *J. Infect. Dis.*, 1974; 129: 101-109
- [20] Staugas R.E., Harvey D.P., Ferrante A., Nandoskar M., Allison A.C.: Induction of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) by *Pseudomonas aeruginosa* and exotoxin A-induced suppression of lymphoproliferation and TNF lymphotoxin, gamma interferon and IL-1 production in human leukocytes. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 3162-3168
- [21] Trafny E.A., Oldak E.: III system sekrecji białek u *Pseudomonas aeruginosa*. *Post. Mikrobiol.*, 2001; 40: 129-150
- [22] Usher L.R., Lawson R.A., Geary I., Taylor C.J., Bingle C.D., Taylor G.W., Whyte M.K.: Induction of neutrophil apoptosis by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. 2002; 168: 1861-1868
- [23] Wilson R., Pitt T., Taylor G., Watson D., MacDermot J., Sykes D., Roberts D., Cole P.: Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 1987; 79: 221-229
- [24] Woods D.E., Hwang W.S., Shahrabadi M.S., Que J.U.: Alteration of pulmonary structure by *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S. *J. Med. Microbiol.*, 1988; 26: 131-141
- [25] Zughaier S.M., Ryley H.C., Jackson S.K.: Lipopolysaccharide (LPS) from *Burkholderia cepacia* is more active than LPS from *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in stimulating tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *Infect. Immun.*, 1999; 67: 1505-1507