

Patogeneza zakażeń wywołanych przez szczepy *Escherichia coli* syntetyzujące toksyny Shiga (STEC)

JAN TWARDOŃ, BEATA MAGDALENA SOBIESZCZAŃSKA*, ROMUALD GRYKO**

Katedra i Klinika Rozrodu, Chorób Przeżuwaczy oraz Ochrony Zdrowia Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, Plac Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

*Katedra i Zakład Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław

**Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

Twardoń J., Sobieszczańska B. M., Gryko R.

Pathogenesis of Shiga-like toxins-producing *Escherichia coli* (STEC) infections

Summary

Infections with Shiga-like toxins - producing *Escherichia coli* (STEC) strains presents with a wide spectrum of clinical manifestations, including bloody diarrhea, hemorrhagic colitis, and hemolytic uremic syndrome that is an important cause of acute renal failure. STEC strains produce Shiga-like toxins that are thought to have direct pathogenic significance in STEC infections. Together with inflammatory mediators Shiga-like toxins contributes to the target organ injury. The toxins have been found to be cytotoxic and stimulatory. In the article, on the basis of recent advantages, the pathogenesis of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome is presented.

Keywords: *E. coli*, STEC

Szczepy *Escherichia coli* (STEC) syntetyzujące toksyny Shiga (Stx) odpowiedzialne są za zakażenia u ludzi, które mogą przebiegać jako bezobjawowe nosicielstwo, w formie biegunek i krwotoczne zapalenie jelita grubego (HC – hemorrhagic colitis) oraz uogólnionych, zagrażających życiu zespołów klinicznych – hemolitycznego zespołu mocznicowego (HUS – hemolytic uremic syndrome) lub małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP – thrombotic thrombocytopenic purpura) (1, 5, 11). U bydła, które stanowi główny rezerwuar STEC, zakażenia mają najczęściej charakter bezobjawowego nosicielstwa u dorosłych osobników lub ograniczają się do biegunek u młodych cieląt, nigdy jednak nie przybierają form uogólnionych (10, 11).

Niektóre szczepy STEC, określane mianem enterokrwootocznych *E. coli* (EHEC), poza zdolnością do syntezy Stx posiadają zespół chromosomalnych genów (tzw. wyspę patogenności LEE), odpowiedzialnych za ekspresję bakteryjnych białek, m.in. intiminy. Ścisłe połączenie *E. coli* z enterocytami za pośrednictwem intiminy prowadzi do zniszczenia struktury rąbka szczoteczki nabłonka jelita, a tym samym jego powierzchni chłonnej i w efekcie do rozwoju biegunki. Szczepy *E. coli* posiadające wyspę patogenności LEE, nawet pozbawione zdolności syntezy Stx nadal zachowują swój potencjał chorobotwórczy, jednak ograniczony tylko do przewodu pokarmowego (11).

Poza toksynami Shiga *E. coli* i LEE opisano szereg dodatkowych czynników wirulencji wykrywanych z różną częstością wśród szczepów STEC i EHEC, np.: enterohemolizyna, proteazy serynowe, jednak ich rola w patomechanizmie zakażeń jest tylko przypuszczalna, gdyż

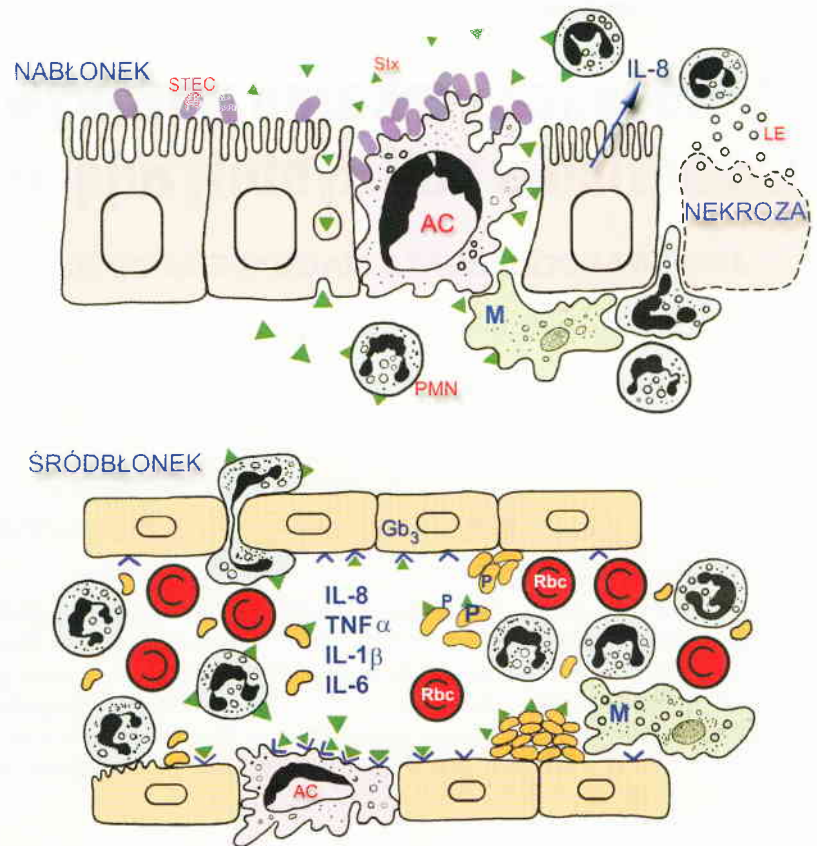
brak dowodów na ich toksycznego działania *in vivo* na organizm człowieka i zwierząt (9).

Rozwój zakażenia STEC jest procesem wielostopniowym. Podobnie jak w przypadku innych patogenów jelitowych wrotami zakażenia jest przewód pokarmowy. Kwaśna treść żołądka stanowi barierę chroniącą jelito, likwidując większość spożywanych wraz z pokarmem bakterii. Drobnoustroje patogenne rozwinęły jednak szereg mechanizmów umożliwiających im przeżywanie w ekstremalnie niskich wartościach pH. W badaniach *in vitro* szczepy *E. coli* O157:H7 przeżywały w środowisku o pH < 2,5. Oporność na niskie pH środowiska jest u STEC kontrolowana przez trzy niezależne systemy regulujące tzw. antytransport, tj. aktywne usuwanie jonów wodorowych, co chroni wewnętrzne pH komórki bakteryjnej przed obniżeniem do poziomu letalnego (4, 20).

Uniknąwszy zniszczenia w kwaśnej treści żołądka, pomimo małej dawki zakaźnej (dla człowieka wynosi ona 1-100 komórek bakteryjnych), STEC dostają się do jelita i kolonizują dolny odcinek przewodu pokarmowego, tj. dystalną część jelita cienkiego oraz okrężnicę (7, 9). STEC mogą wiązać się z fosfatydyloetanolaminą (PE), obecną w błonie plazmatycznej enterocytów, chociaż nie scharakteryzowano adhezyny odpowiedzialnej za to połączenie (2, 3). Poza adhezją, połączenie bakterii z PE prowadzi do apoptozy (programowanej śmierci) i nekrozy komórek nabłonka. Zniszczenie w wyniku tych procesów struktury błony plazmatycznej enterocytów jest przyczyną wzrostu ilości PE na powierzchni komórek. Indukcja apoptozy i nekrozy może więc stanowić bakteryjną strategię prowadzącą do zwiększenia liczby receptorów i lepszej adhezji do nabłonka jelita (2, 8).

Toksyny Shiga *E. coli* (Stx) są głównym czynnikiem wirulencji STEC. Lokalizację uszkodzeń w organizmie gospodarza oraz cytotoksyczne działanie Stx determinuje obecność swoistego dla toksyn Shiga *E. coli* receptora glikolipidowego Gb₃ na powierzchni komórek docelowych. Komórki śródbłonka włosowatych naczyń krwionośnych kłębuszków nerkowych oraz centralnego układu nerwowego i organów wewnętrznych (trzustka, płuca) wykazują duże stężenie Gb₃, stąd objawy uogólnione w zakażeniach szczepami STEC dotyczą tych właśnie układów – moczowego w zespole HUS oraz centralnego układu nerwowego i narządów wewnętrznych w TTP (9, 16, 18). Stx mogą także wiązać się z Gb₃ i jego odmianami obecnymi na różnych typach komórek, np.: komórkach nabłonka, erytrocytach, monocytach oraz płytkach krwi (9). Zasadniczo komórki nabłonka jelita są niewrażliwe na działanie Stx, co wynika z braku na ich powierzchni receptora Gb₃ (8). Choć niektóre, ciągle linie komórkowe wywodzące się z nabłonka jelita, np. Caco-2, wykazują słabą ekspresję Gb₃, nie ulegają one uśmiercaniu nawet pod wpływem wysokich dawek Stx (6, 12).

Początkowe badania patomechanizmu działania toksyn Shiga *E. coli* na komórki eukariotyczne sprowadzały ich aktywność do hamowania biosyntezy białka przez podjednostkę enzymatyczną A. Rzeczywiście, Stx mogą wykazywać takie działanie na niektóre typy komórek, ale aktywność ta wymaga współdziałania cytokin (TNF- α , IL-1 β), które zwiększając w komórkach syntezę i ekspresję powierzchniowego receptora Gb₃, uwrażliwiają je na cytotoksyczne działanie Stx. Ponadto, efekt interakcji Stx z komórką w dużym stopniu zależy od rodzaju reszt kwasów tłuszczowych receptora Gb₃ (9). Interakcja Stx z komórkami gospodarza może prowadzić do zróżnicowanych efektów. W przypadku komórek nabłonka jelita Stx stymuluje w nich syntezę i uwalnianie interleukiny IL-8 (1, 11, 13-15). Do aktywności tej konieczna jest podjednostka enzymatyczna A toksyny, która paradoksalnie, z jednej strony hamuje w komórkach nabłonka jelita translację mRNA, a z drugiej, indukuje wzmoczoną translację mRNA IL-8, jej syntezę i sekrecję. Sugeruje się, że Stx uszkodzając podjednostkę 28S rRNA rybosomu, wywołują szok rybotoksyczny z następczym wzbudzeniem transdukcji sygnału, indukującego jedno z białek (p38/RK) rodziny kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK), co ostatecznie prowadzi do aktywacji niektórych genów i syntezy IL-8 (19). Dalsze badania mechanizmu działania Stx w obrębie jelita zdają się potwierdzać ogromną rolę odpowiedzi immunologicznej przewodu pokarmowego na dalsze losy zakażenia STEC. IL-8 jest silnym chemoatraktem oraz aktywatorem neutrofilów. Indukowana działaniem Stx sekrecja IL-8 przyciąga na powierzchnię błony śluzowej jelita neutrofile, które uwalniając z ziarnistości toksyczne rodniki tlenowe, proteazy i inne związki prozapalne, przyczyniają się do uszkodzenia nabłonka. IL-8 może również, podobnie jak czynnik TNF- α , indukować wzmoczoną eks-



Ryc. 1. Model patogenezy zakażeń STEC (opis w tekście)

Objaśnienia: STEC – szczepy *E. coli* syntetyzujące toksyny Shiga, Stx – toksyna Shiga, AC – komórka apoptotyczna, M – makrofag, PMN – limfocyt wielojądrowy (neutrofil), Gb₃ – glikolipidowy, swoisty dla Stx receptor komórkowy, P – płytki krwi, Rbc – erytrocyty, IL-8 – interleukina 8, TNF- α – czynnik nekrotyzujący α

presję receptora Gb₃ na powierzchni komórek nabłonka. Dodatkowo, transmigracja neutrofilów (a także monocytów i makrofagów) na powierzchnię błony śluzowej jelita połączona jest z uszkodzeniem bariery nabłonka i wzrostem przepuszczalności ścian jelita. Procesy te ostatecznie prowadzą do rozwoju odczynu zapalnego, powstania zmian nekrotycznych, owrzodzenia i krwawienia błony śluzowej jelita, a więc charakterystycznych zmian histopatologicznych obserwowanych u pacjentów z HC (7, 17, 19).

Rozwój ogólnoustrojowych objawów zakażenia (HUS, TTP) szczepami STEC związany jest z wtargnięciem toksyn Shiga *E. coli* do krwiobiegu. STEC są nieinwazyjne i nie przedostają się poza blaszkę podstawną błony śluzowej jelita (11, 13). W warunkach fizjologicznych szczelna bariera nabłonka jelita czyni je nieprzepuszczalnym. Większe cząsteczki, np. białek, mogą pokonywać barierę nabłonka w dwojaki sposób: przechodząc bezpośrednio przez komórki na drodze endocytozy (po związaniu się ze swoim receptorem) lub pinocytozy (endocytoza nie wymagająca obecności swoistego receptora), albo też przez zniszczone, nieszczelne połączenia między komórkami nabłonka (7). W zakażeniach szczepami STEC uprzedni rozwój procesów zapalnych błony śluzowej jelita oraz transmigracja komórek układu immunologicznego prowadzą do zniszczenia bariery nabłonka, otwierając Stx drogę do krwiobiegu (13). W biopsjach błony śluzowej jelita pacjentów zakażonych STEC, w blaszce podstawnej oraz kryptach

jelita stwierdza się infiltrację neutrofilami. Stopień rozległości zapalenia błony śluzowej jelita może więc korelować z ilością Stx dostającej się do krążenia i stanowić o rozwoju HUS. Ponadto udowodniono, że neutrofile, z którymi wiąże się Stx, stanowią „środek transportu” toksyny ze światła jelita do krwiobiegu (7, 13, 17). Stx nie wykazują działania cytotoksycznego w stosunku do komórek układu immunologicznego, pomimo zdolności wiązania się z ich glikolipidowymi (podtypami Gb₃ i nie-Gb₃) receptorami powierzchniowymi, co stanowi kolejny przykład zróżnicowanych interakcji pomiędzy Stx a komórkami gospodarza (7, 13). Toksyny Shiga *E. coli* mogą również osiągać krążenie w wyniku bezpośredniej translokacji przez nieuszkodzony, spolaryzowany nabłonek jelita, nie tracąc przy tym swej aktywności biologicznej. Transcytoza toksyn przez komórki nabłonka zachodzi w obrębie pęcherzyków z wykorzystaniem systemu mikrotubularnego komórek od szczytowej do podstawnej części komórki i jest to proces wymagający energii. W procesie tym nie wykazano udziału receptora Gb₃. Sugeruje się, że wiązanie toksyn z powierzchnią komórek nabłonka odbywa się za pośrednictwem alternatywnego receptora białkowego, którego obecność wykazano także na komórkach linii Vero. Połączenie Stx z tym receptorem, a następnie transcytoza nie tylko nie prowadzi do śmierci komórek, ale wręcz hamuje w nich proces apoptozy (6, 12).

Wiążąc przedostającą się do krwiobiegu Stx, komórki układu immunologicznego (neutrofile, monocyty/makrofagi) pełnią rolę „konia trojańskiego” transportującego śmiertelnie toksynę do wrażliwych, obfitujących w Gb₃ docelowych komórek śródbłonna włosowatych naczyń krwionośnych. Jak wspomniano wcześniej, Stx wywiera swoje działanie cytotoksyczne na komórki śródbłonna po uprzedniej ich stymulacji cytokinami. Wykazano, że połączenie Stx z podtypem receptora Gb₃ obecnym na powierzchni monocytów indukuje je do syntezy i sekrecji cytokin prozapalnych: czynnika nekrotyzującego TNF- α oraz interleukin: IL-1 β , IL-6 i IL-8 na drodze niezależnej od LPS (1, 11, 13-15, 19). TNF- α jest kluczową cytokiną prozapalną, która pobudza rozwój procesu zapalnego i powstawanie zakrzepów w naczyniach krwionośnych oraz wzmoczoną syntezę i ekspresję receptora Gb₃, a także cząstek adhezyn dla leukocytów na powierzchni śródbłonna. Chemokina IL-8 rekrutuje neutrofile i stymuluje je do uwalniania enzymów lizosomalnych i nadtlenków oraz wzmaga ich adhezję do komórek śródbłonna, co prowadzi do ich mechanicznego uszkodzenia (1). Ligacja Stx z Gb₃ na powierzchni komórek śródbłonna prowadzi do ich śmierci na drodze apoptozy, którą indukuje zahamowanie biosyntezy białek komórkowych, m.in. białek antyapoptycznych, charakteryzujących się krótkim okresem półtrwania – ich brak stymuluje kaskadę apoptozy (1). Konsekwencją łączenia się Stx lub tylko jej podjednostki wiążącej B z płytkami krwi, za pośrednictwem ich glikosfingolipidowego receptora, są zmiany struktury powierzchniowej płytek. Wykazują one zwiększone wiązanie fibrynogenu i ulegają zlepianiu, tworząc mikrozakrzepy, które zaczopowując światło włosowatych naczyń krwionośnych, zaburzają ukrwienie nerek (lub innych tkanek narządów wewnętrznych), ostatecznie prowadząc do ich uszkodzenia i trombocytopenii (9).

Podsumowanie

Początkowe wyniki badań patomechanizmu działania Stx ograniczyły ich aktywność do hamowania biosyntezy białka w komórkach, prowadzącej do ich śmierci. Obecnie wiele uwagi poświęca się immunomodulacyjnej aktywności toksyny Shiga, która, jak się wydaje, odgrywa wiodącą rolę w zakażeniach STEC. Uwalniane pod wpływem Stx cytokiny potęgują cytotoksyczne działanie toksyn oraz determinują, podobnie jak typ receptora glikolipidowego danego typu komórek, efekt końcowy interakcji Stx z komórką gospodarza. Indukowana działaniem toksyn Shiga *E. coli* lokalna odpowiedź immunologiczna przebiegu pokarmowego zdaje się wpływać na dalsze losy zakażenia i decydować o rozwoju zespołu HUS.

Piśmiennictwo

1. Adler S., Bollu R.: Glomerular endothelial cell injury mediated by Shiga-like toxin-1. *Kidney Blood Press Res.* 1998, 21, 13-21.
2. Barnett-Foster D., Abul-Milh M., Huesca M., Lingwood C. A.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* induces apoptosis which augments bacterial binding and phosphatidyloethanolamine exposure on the plasma membrane outer leaflet. *Infect. Immun.* 2000, 68, 3108-3115.
3. Barnett-Foster D., Philpott D., Abul-Milh M., Huesca M., Sherman P. M., Lingwood C. A.: Phosphatidyloethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host attachment. *Microb. Pathog.* 1999, 27, 289-301.
4. Castanie-Cornet M. P., Penfound T. A., Smith D., Elliot J. F., Foster J. W.: Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 3525-3535.
5. Chinyu S., Lawrence J., Brandt M. D.: *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans. *Ann. Intern. Med.* 1995, 123, 698-714.
6. Hurley B. P., Jacewicz M., Thorpe C. M., Lincicome L. L., King A. J., Keusch G. T., Acheson D. W.: Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1999, 67, 6670-6677.
7. Hurley B. P., Thorpe C. M., Acheson D. W.: Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect. Immun.* 2001, 69, 6148-6155.
8. Jones N. L., Isler A., Haq R., Mascarenhas M., Karmali M. A., Perdue M. H., Zanke B. W., Sherman P. M.: *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bel-2 family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000, 278, G811-G819.
9. Karpan D., Papadopoulou D., Nilsson K., Sjögren A. C., Mikaelsson C., Lethagen S.: Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2001, 97, 3100-3108.
10. Mainil J.: Shiga/verocytotoxins and Shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Vet. Res.* 1999, 30, 235-257.
11. Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 450-479.
12. Philpott D. J., Ackerley C. A., Kilian A. J., Karmali M. A., Perdue M. H., Sherman P. M.: Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am. J. Physiol.* 1997, 273, G1349-G1358.
13. Proulx F., Seidman E. G., Karpman D.: Pathogenesis of shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res.* 2001, 50, 163-171.
14. Sakiri R., Ramegowda B., Tesh V. L.: Shiga toxin type 1 activates tumor necrosis factor- α gene transcription and nuclear translation of the transcriptional activators nuclear factor- κ B and activator protein-1. *Blood* 1998, 92, 558-566.
15. Smith W. E., Kane A. V., Campbell S. T., Acheson D. W., Cochran B. H., Thorpe C. M.: Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 2003, 71, 1497-1504.
16. Taguchi T., Uchida H., Kiyokawa N., Mori T., Sato N., Horie H., Takeda T., Fujimoto J.: Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. *Kidney Int.* 1998, 53, 1681-1688.
17. Te Loo D. M., van Hinsbergh V. W., van den Heuvel L. P., Monnens L. A.: Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, 800-806.
18. Tesh V. L., O'Brien A. D.: The pathogenic mechanisms of shiga toxin and the shiga-like toxins. *Mol. Microbiol.* 1991, 5, 1817-1822.
19. Thorpe C. M., Hurley B. P., Lincicome L. L., Jacewicz M. S., Keusch G. T., Acheson D. W.: Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 1999, 67, 5985-5993.
20. Waterman S. R., Small P. L.: Acid sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acid conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3882-3886.