

# Úloha pohlavných hormónov pri infekciách močových ciest

MVDr. Alena Potočárová<sup>1</sup>

Spoluautori: Mgr. Veronika Šarayová<sup>1</sup>, Mgr. Alexandra Gaál-Kovalčíková PhD.<sup>2</sup>, Mgr. Michal Pastorek PhD.<sup>1</sup>, Andrej Kirm<sup>1</sup>, RNDr. Ľubomíra Tóthová PhD.<sup>1</sup>  
Školiteľ: prof. MUDr. Peter Boor PhD.<sup>1 3</sup>

<sup>1</sup> Ústav Molekulárnej Biomedicíny, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

<sup>2</sup> Národný Ústav Detských Chorôb, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovensko

<sup>3</sup> Ústav Patológie, RWTH Aachen, Nemecko

## Úvod

Infekcie močových ciest (IMC) patria k najčastejším bakteriálnym infekciám, ktoré sa neúmerne častejšie vyskytujú u žien. Avšak, u mužov sú IMC sprevádzané vyšším výskytom komplikácií aj mortality (1, 2). Tieto rozdiely sa pripisujú odlišnej anatómii močového traktu, ako je dĺžka a tvar močovej rúry či hygienickým faktorom (3). Tieto predpoklady však neboli experimentálne preukázané, a tiež nevysvetľujú skutočnosť, že u starších ľudí a detí sa IMC vyskytujú rovnako často u oboch pohlaví (4). Viaceré klinické štúdie preukázali preventívny účinok estradiolu v liečbe IMC, na druhej strane, iné dokázali opak (3, 5–8). Nedávne štúdie tiež naznačujú, že testosterón priamo vplyva na priebeh IMC a prispieva ku vzniku komplikácií (4, 9). Napriek tomu, presný mechanizmus akým testosterón pôsobí nebol doteraz objasnený. Pohlavné hormóny pôsobia primárne v pohlavných orgánoch, avšak androgénové a estrogénové receptory sa nachádzajú aj na progenitorových bunkách kostnej drene, bunkách lymfatického tkaniva, lymfocytoch, makrofágoch a na dendritických bunkách (10), kde testosterón, estrogén aj progesterón zohrávajú významnú úlohu vo formovaní špecifickej či nešpecifickej imunitnej odpovede (11). Interleukín 10 (IL-10) je produkovaný viacerými bunkami ako sú makrofágy, dendritické bunky, či lymfocyty a je dôležitým protizápalovým cytokínom regulujúcim najmä nešpecifickú imunitnú odpoveď cez tzv. toll-like receptory (12).

Naším cieľom preto bolo sledovať úlohu pohlavných hormónov v imunitnej odpovedi v animálnom modeli IMC, u myši kmeňa C3H/HeN a C3H/HeJ. Myši kmeňa C3H/HeJ majú spontánne mutovaný toll-like receptor 4 (TLR4), ktorý je zodpovedný za nešpecifickú imunitnú odpoveď. Tieto myši sú rezistentné na endotoxín gramnegatívnych baktérií *E. coli*. Vzhľadom na to, že jedinci so zníženou expresiou TLR4 majú močový mechúr častejšie asymptomaticky kolonizovaný uropatogénnymi baktériami *E. coli* (13), našou hypotézou bolo, že u TLR4- myši bude prítomná slabšia imunitná odpoveď.

## Materiál a metódy

V experimente bolo použitých 51 dospelých myši kmeňa C3H/HeN (TLR4+; samce n=13, samice n=12) a C3H/HeJ (TLR4-; samce n=12, samice n=14). Zvieratá boli rozdelené do 2 skupín pre obe pohlavia, pričom jednej skupine boli chirurgicky odstránené príslušné pohlavné žľazy (orchiektomované samce = GDX♂ a ovariektomované samice = OVX♀), druhá skupina zvierat podstúpila rovnakú procedúru bez odstránenia pohlavných orgánov (Sham♂ a Sham♀). Po 4 mesiacoch od gonadektómie, boli zvieratám oboch skupín aj pohlaví mini-invazívnym prístupom podané uropatogénne baktérii *E. coli* (10<sup>7</sup> CFU) (9). Následne, po 24 hodinách od navodenia infekcie, boli zvieratá usmrtené v celkovej anestézii a bola im odobratá krv, obličky a močový mechúr. Následne bola krv bola centrifugovaná na 1600xg a v plazme bola stanovená koncentrácia testosterónu (DRG, Instruments GmbH,

Marburg, Nemecko) a protizápalového cytokínu, IL-10 (LEGENDplex™ Mouse Inflammation Panel, Biolegend, San Diego, Kalifornia).

Obličky a močový mechúr boli zhomogenizované a 24 hodín kultivované na LB médiu za účelom zistenia počtu baktérií v jednotlivých orgánoch.

Výsledky boli analyzované prostredníctvom ANOVA s následným Tukey post hoc testom v programe Graphpad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia). Dáta sú prezentované ako priemer a smerodajná odchýlka (SD).

## Výsledky

Dvadsaťštyri hodín od navodenia infekcie sme pozorovali signifikantne nižšiu koncentráciu baktérií *E. coli* v močovom mechúri v skupine TLR4+ GDX♂ oproti skupine Sham♂ (Obr. 1A,  $p=0,005$ ), nie však v obličkách (Obr. 1A,  $p=0,89$ ). V prípade kmeňa TLR4- sme nepozorovali štatisticky významné rozdiely v počte baktérií v močovom mechúri, ani v obličkách medzi skupinou GDX♂ a skupinou Sham♂ (Obr. 2A,  $p=0,79$ ;  $p=0,52$ , v tomto poradí). U samíc kmeňa TLR4+ sme 24 hodín od navodenia infekcie pozorovali podobný trend ako u samcov TLR4+ v kultivačnom záchyte baktérií v oboch orgánoch, avšak rozdiely neboli štatisticky významné (Obr. 1B  $p=0,31$  a  $p=0,93$  v tomto poradí). V prípade samíc kmeňa TLR4- sme medzi skupinami OVX♀ a Sham♀ nepozorovali rozdiely v počte baktérií v močovom mechúri, ani v obličkách (Obr. 2B,  $p=0,32$  a  $p=0,99$ , v tomto poradí).

V skupine zvierat TLR4+ sme v močovom mechúri zistili signifikantne vyšší počet baktérií u samcov v porovnaní so samicami toho istého kmeňa ( $p=0,01$ ), a bez rozdielu v počte baktérií v obličkách ( $p=0,49$ ). U zvierat z kmeňa TLR4- tento medzipohlavný rozdiel v závažnosti IMC vyjadrený počtom baktérií v močovom mechúri a v obličkách nebol štatisticky významný (močový mechúr  $p=0,23$  a pre obličky  $p=0,13$ ).

Koncentrácia nameraného testosterónu bola u myši oboch kmeňov signifikantne nižšia u GDX♂ v porovnaní s príslušnými Sham♂ skupinami (TLR4+  $p = 0,018$ , TLR4-  $p = 0,014$ ; Obr. 1, 2 C). Keďže koncentrácie estradiolu nie je technicky možné u myši stanoviť, hodnotili sme aj u samíc koncentrácie testosterónu. U OVX♀ samíc oboch kmeňov sme pozorovali trend k vyššej koncentrácii testosterónu v porovnaní so Sham♀ skupinou, avšak rozdiely neboli štatisticky významné v žiadnom z kmeňov (TLR4+  $p=0,99$ , TLR4-  $p=0,74$ ; Obr.1, 2C).

TLR4+ GDX♂ samce, ktoré mali aj nižší testosterón, mali zároveň nižšiu koncentráciu cytokínu IL-10 v porovnaní so Sham samcami toho istého kmeňa (Obr.1D,  $p=0,06$ ). Obdobne, samice zo skupiny TLR4+ OVX♀ a nesignifikantne vyšším testosterónom, mali vyššie koncentrácie cytokínu IL-10 (Obr. 1D,  $p=0,28$ ) a trend k väčšiemu počtu baktérií zachytených kultiváciou v močovom mechúri aj obličkách v porovnaní so Sham♀ toho istého kmeňa. U skupín TLR4- nebol rozdiel v koncentráciách IL-10 (Obr. 2D,  $p=0,75$  pre samice a  $p=0,99$  pre samce, v tomto poradí).

(Pozn. Pre lepšiu prehľadnosť výsledkov, neuvádzame konkrétne priemery a odchýlky v samotnom texte výsledkov, ale je možné ich vidieť na obrázkoch.)

## Diskusia

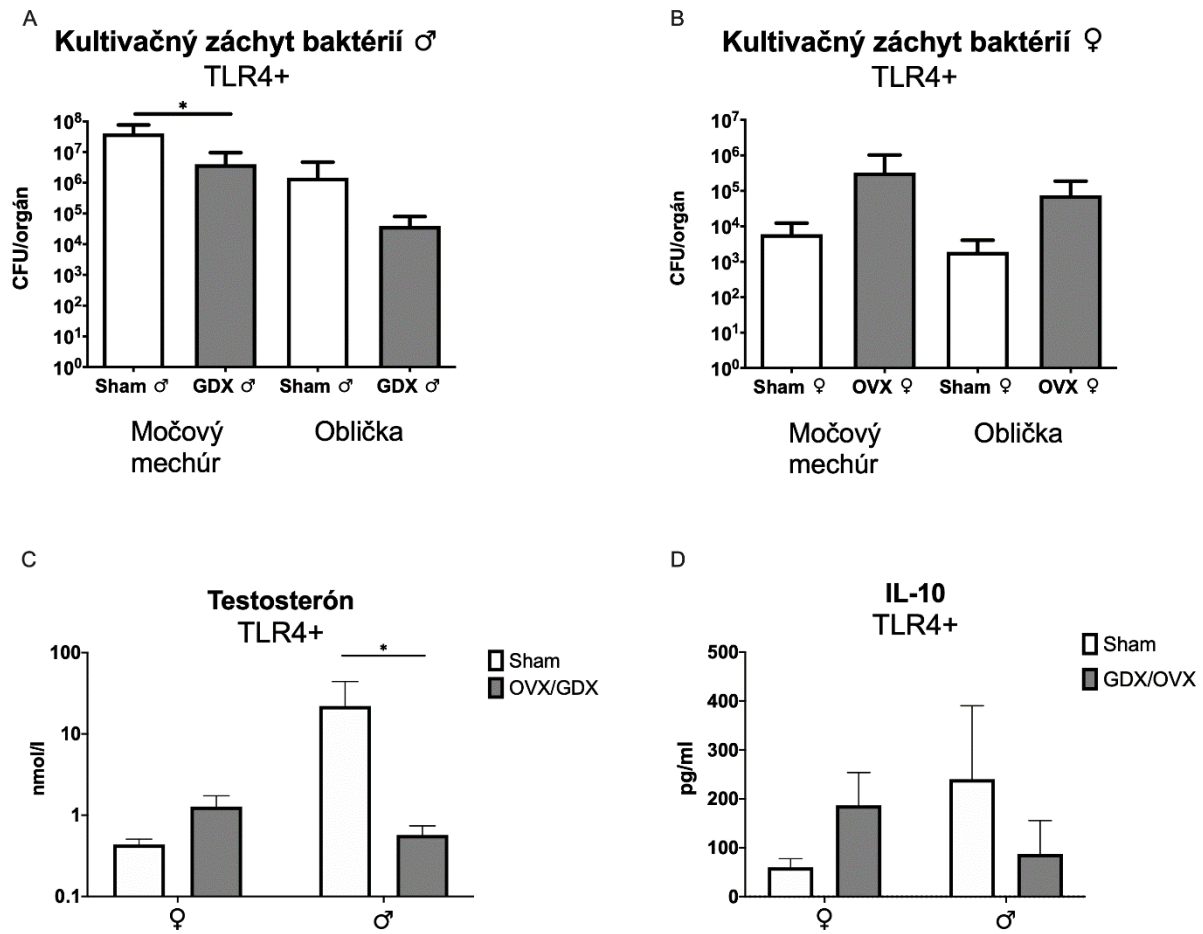
V našom experimente TLR4+ (C3H/HeN) zvieratá s najvyššou koncentráciou IL-10 mali aj vyššie počty baktérií v močovom mechúri, aj v obličkách. Pri IMC je to práve nešpecifická imunita, ktorá zabraňuje ďalšej progresii a ascendentnej infekcii z močového mechúra. Môžeme teda predpokladať, že potlačenie nešpecifickej imunity IL-10 viedlo k ascendentnej infekcii do obličiek a celkovo teda slabšia imunitná odpoveď viedla k závažnejšiemu priebehu infekcie. Jedným z mechanizmov formovania imunitnej odpovede je aj vplyv pohlavných hormónov, ako je testosterón, na produkciu protizápalového cytokínu IL-10, ktorý je dôležitým inhibítorom nešpecifickej imunity (14). Po 24 hodinách od navodenia

IMC aj v obličkách bola nižšia koncentrácia IL-10 u gonadektomovaných samcov v porovnaní so Sham zvieratami. Podobne u TLR4+ samíc, ovariektómia viedla k vyššiemu testosterónu a zároveň aj k trendu vyššej koncentrácie IL-10, a zároveň aj k vyššiemu kultivačnému záchytu. U TLR4- (C3H/HeJ) zvierat tento rozdiel a trend nebol pozorovaný. Z našich dát je preto pravdepodobné, že je to testosterón, ktorý zvýšil sekréciu IL-10, a ten aj cez TLR4 inhiboval samotnú imunitnú reakciu organizmu.

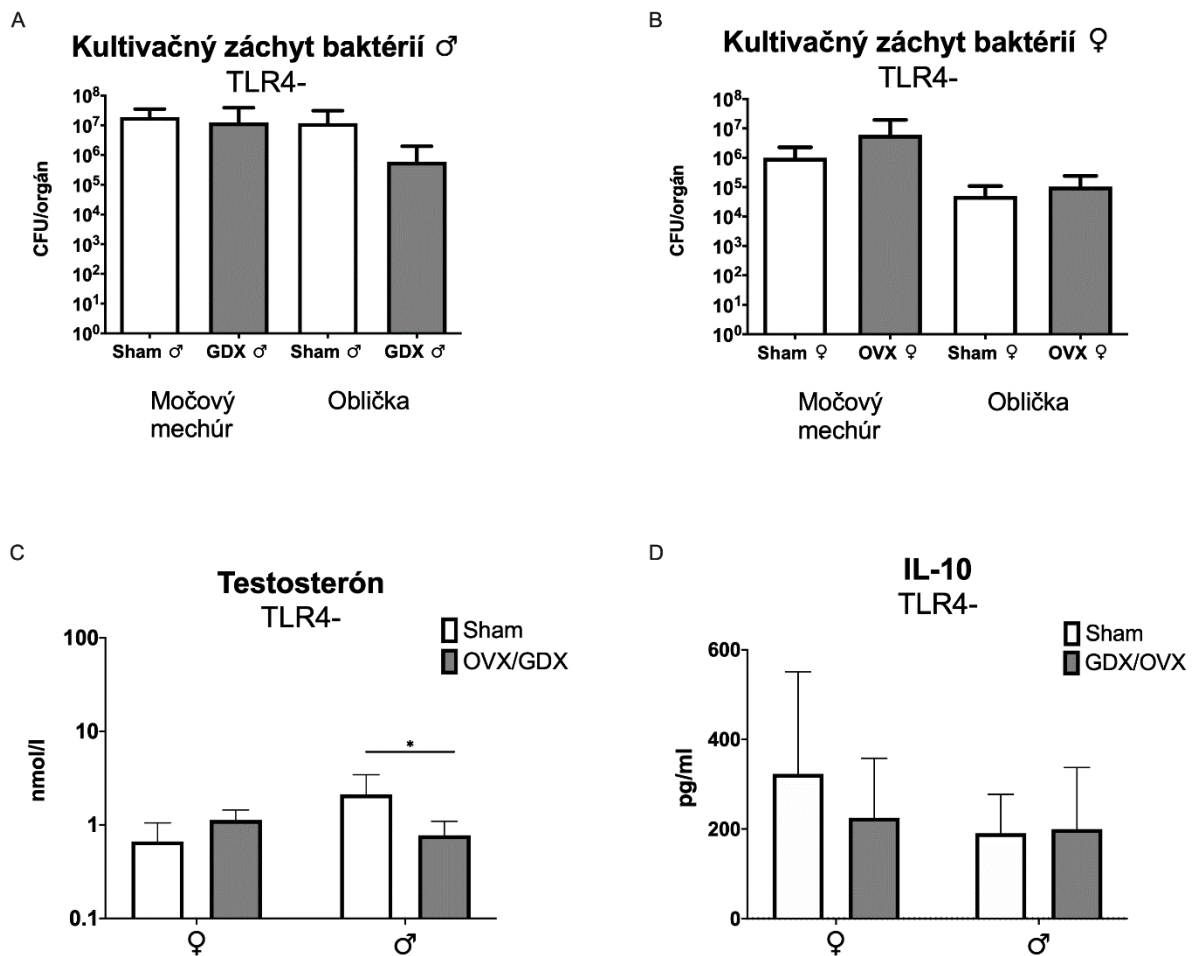
Jednou z limitácií experimentu je, že z technických dôvodov nie je možné stanoviť koncentrácie estradiolu u samíc. Nakoľko časť produkcie pohlavných hormónov zabezpečujú u samíc nadobličky, je možné, že po ovariektómii nemuselo dôjsť k výraznému poklesu estradiolu. V našom experimente sme tiež nesledovali diurézu, ani samotný príjem tekutín. Znížený príjem tekutín však môže zhoršiť samotný priebeh infekcie (15). Navyše, nemôžeme vylúčiť vplyv pohlavných hormónov na diuretický účinok vazopresínu (16). Dôležitou limitáciou je aj fakt, že efekt IL-10 zatiaľ nebol overený, napríklad sledovaním aktivácie neutrofilov, ktoré sú ako jedny z prvých aktivované pri nešpecifickej imunitnej odpovedi.

Pochopenie patofyziologických mechanizmov medzipohlavných rozdielov môže viesť k zefektívneniu terapie a prevencii vzniku IMC, prípadne k rozvoju tzv. personalizovanej medicíny. V našej pilotnej štúdií sme poukázali na to, že vyššie koncentrácie testosterónu vedú k zvýšeniu protizápalového cytokínu a cez aktiváciu TLR4 k poklesu imunity, čo má za následok väčší počet baktérií v sledovaných orgánoch. Presný molekulárny mechanizmus ostáva však neznámy a je preto potrebné overiť ho v budúcich štúdiách.

*Práca bola podporená grantom Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky (grantové číslo - VEGA 1/0234/18).*



Obr. 1 Namerané hodnoty u TLR4+ myši (C3H/HeN): Počet baktérií v močovom mechúre a obličke u samcov (A), Počet baktérií v močovom mechúre v obličke u samíc (B). Koncentrácia testosterónu u jednotlivých skupín myši (C). Koncentrácia IL10 u jednotlivých skupín myši (D). Dáta sú uvedené ako priemer a smerodajná odchýlka. TLR4+ = myši kmeňa C3H/HeN, s funkčným toll-like 4 receptorom, Sham♀ = intaktné samice, OVX♀ = ovariectomované samice, Sham♂ = intaktní samci, GDX♂ = orchiektomovaní samci., \* =  $p < 0,05$



Obr. 2 Namerané hodnoty TLR4- myši (C3H/HeJ): Počet baktérií v močovom mechúre a obličke u samcov (A), Počet baktérií v močovom mechúre v obličke u samíc (B). Koncentrácia testosterónu u oboch pohlaví myši (C). Koncentrácia IL10 u oboch pohlaví myši (D). Dáta sú uvedené ako priemer a smerodajná odchýlka. TLR4- = myši kmeňa C3H/HeJ, s mutovaným toll-like 4 receptorom, Sham♀ = intaktné samice, OVX♀ = ovariectomované samice, Sham♂ = intaktní samci, GDX♂ = orchiektomovaní samci, \* =  $p < 0,05$

## Zoznam použitej literatúry

1. B. Foxman, K. L. Klemstine, P. D. Brown, Acute pyelonephritis in US hospitals in 1997: Hospitalization and in-hospital mortality. *Ann. Epidemiol.* (2003), doi:10.1016/S1047-2797(02)00272-7.
2. M. Tandan, S. Duane, M. Cormican, A. W. Murphy, A. Vellinga, Reconsultation and antimicrobial treatment of urinary tract infection in male and female patients in general practice. *Antibiotics* (2016), doi:10.3390/antibiotics5030031.
3. N. Sihra, A. Goodman, R. Zakri, A. Sahai, S. Malde, Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **15**, 750–776 (2018).
4. A. Z. Scharff, M. Rousseau, L. L. Mariano, T. Canton, C. R. Consiglio, M. L. Albert, M. Fontes, D. Duffy, M. A. Ingersoll, Sex differences in IL-17 contribute to chronicity in male versus female urinary tract infection. *JCI Insight.* **4**, 1–19 (2019).
5. P. D. Olson, L. K. McLellan, T. N. Hreha, A. Liu, K. E. Briden, K. A. Hruska, D. A. Hunstad, Androgen exposure potentiates formation of intratubular communities and renal abscesses by *Escherichia coli*. *Kidney Int.* (2018), doi:10.1016/j.kint.2018.04.023.
6. P. Lühje, H. Brauner, N. L. Ramos, A. Övregaard, R. Gläser, A. L. Hirschberg, P. Aspenström, A. Brauner, Estrogen supports urothelial defense mechanisms. *Sci. Transl. Med.* **5** (2013), doi:10.1126/scitranslmed.3005574.
7. R. Raz, W. E. Stamm, A Controlled Trial of Intravaginal Estriol in Postmenopausal Women

- with Recurrent Urinary Tract Infections. *N. Engl. J. Med.* (1993), doi:10.1056/NEJM199309093291102.
8. E. M. Curran, A. H. Tassell, B. M. Judy, B. Nowicki, V. Montgomery-Rice, D. M. Estes, S. Nowicki, Estrogen Increases Menopausal Host Susceptibility to Experimental Ascending Urinary-Tract Infection. *J. Infect. Dis.* (2007), doi:10.1086/511275.
  9. P. D. Olson, K. A. Hruska, D. A. Hunstad, Androgens Enhance Male Urinary Tract Infection Severity in a New Model. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 1625–1634 (2016).
  10. A. Trigunaite, J. Dimo, T. N. Jørgensen, Suppressive effects of androgens on the immune system. *Cell. Immunol.* **294**, 87–94 (2015).
  11. S. L. Klein, K. L. Flanagan, Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 626–638 (2016).
  12. L. Ordeix, S. Montserrat-Sangra, P. Martinez-Orellana, M. Baxarias, L. Solano-Gallego, Toll-like receptors 2,4 and 7, interferon-gamma and interleukin 10, and programmed death ligand 1 transcripts in skin from dogs of different clinical stages of leishmaniosis. *Parasit Vectors.* **12**(1):575 (2019).
  13. M. A. Ingersoll, M. L. Albert, From infection to immunotherapy: Host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal Immunol.* **6**, 1041–1053 (2013).
  14. S. M. Liva, R. R. Voskuhl, Testosterone Acts Directly on CD4 + T Lymphocytes to Increase IL-10 Production. *J. Immunol.* **167**, 2060–2067 (2001).
  15. J. Conka, V. Meliskova, R. Gardlik, J. Hodosy, P. Celec, L. Tothova, Beneficial effects of sugar-sweetened beverages on the risk of urinary tract infections. *Med. Hypotheses.* 127:84-87 (2019).
  16. Y. X. Wang, J. T. Crofton, H. Liu, D. P. Brooks, L. Share, Effects of gonadectomy on sexually dimorphic antidiuretic action of vasopressin in conscious rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **267** (1994), doi:10.1152/ajpregu.1994.267.2.r536.