

FULL PAPERS /LAVORI ORIGINALI

Elevata espressione di *hsp-60* di *Chlamydomphila pneumoniae* su placche aterosclerotiche carotidee a prognosi infausta

Rosario Cultrera¹, Vanessa M. Crapanzano Minichello¹, Lorenzo Badia¹, Matteo Coen²,
Francesco Mascoli², Carlo Contini¹

¹Sezione di Malattie infettive, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, e Chirurgia Vascolare

²Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Anestesiologiche e Radiologiche, Università degli Studi di Ferrara

Key words: *hsp-60*, *Chlamydomphila pneumoniae*, atherosclerosis, carotid

High expression of *hsp-60* gene of *Chlamydomphila pneumoniae* in atheromatous carotid lesions taken from patients with severe disease.

SUMMARY

Some difficult microorganisms, including *Chlamydomphila pneumoniae*, are associated with the atherosclerotic tissue damage. The aim of this study was to evaluate the employment of culture together molecular techniques in order to define the possible role of *C. pneumoniae* in the atherosclerotic tissue damage. Atheromatous carotid plaques (ACP) were obtained by endarterectomies from 10 patients with severe stenosis of the internal carotid artery. Each specimen was divided in three parts: a proximal tract to heart, without stenosis, a medial tract, corresponding to the atheromatous plaque, and a distal tract, above the plaque. Aliquots were employed to perform cultures for *C. pneumoniae* on Hep - 2 cell line in DMEM. DNA and total RNA were extracted from 50-70 mg. of tissue sample and from Hep - 2 10⁶ cultures to investigate 16S rRNA, *momp* and *hsp60* genes. The PCR and RT-PCR resulted negative for *momp* gene of *C. pneumoniae* in all samples. PCR and RT-PCR resulted positive for 16S rRNA or *hsp60* genes of *C. pneumoniae* in the proximal portion of two ACPs with hemorrhagic evolution in two patients, one of which complicated with a retinal thromboembolic outcome. Molecular analyses on *C. pneumoniae* growing from the cultures are in progress. The DNA and RNA amplification of different portions from ACP seems to be useful to evidence the effective localization of *C. pneumoniae* in the atheromatous arterial tissue. The highly gene expression of *C. pneumoniae hsp60* in a patient with acute hemorrhagic evolution of the carotid plaque may suggest that *C. pneumoniae* might participate in the atherogenesis and induce atherosclerosis complications by inflammatory pathways (activation of cytokines, endothelial factors and matrix-degrading metalloproteinases).

INTRODUZIONE

Numerosi studi condotti sulla etiopatogenesi dell'aterosclerosi hanno dimostrato che l'infiammazione della parete dei vasi arteriosi gioca un ruolo essenziale sia nell'innescare il danno, sia nella progressione di esso determinando una erosione, fissurazione e successiva progressione della placca (2). Sebbene l'infiammazione sia presente e dimostrata dall'evidenza di numerosi marcatori (proteina C reattiva, fibrinogeno plasmatico), non sono stati ancora definiti i potenziali fattori che la determinino o che la possano innescare (9). Un possibile ruolo etiopatogenetico potrebbe essere svolto anche da alcuni microrganismi a localizzazione intracellulare quali virus (Cytomegalovirus, Herpes virus, enterovirus) e schizomiceti (*Helicobacter pylori*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) benché i risultati

di queste ricerche sono ancora controversi ed attendono ulteriori conferme (7, 10, 14, 17-18, 21-22). Altri studi recenti hanno messo in evidenza una differente evoluzione della lesione aterosclerotica correlata al flusso emodinamico alterato che si viene a creare nell'arteria colpita (6, 12). Particolare interesse è stato rivolto alla ricerca di *C. pneumoniae* nelle arterie aterosclerotiche e allo studio del suo possibile ruolo nella etiopatogenesi del danno aterosclerotico (2, 16). Le difficoltà di identificazione del patogeno con tecniche dirette al suo isolamento, hanno inizialmente limitato gli studi all'impiego di metodiche sierologiche volte ad evidenziare un titolo anticorpale significativo e, soprattutto, una sierconversione in un periodo di circa 3-4 settimane (2, 7, 16-18). Agli studi sieroepidemiologici hanno fatto seguito altre ricerche basate sull'impiego di tecniche di

colorazione immunistochemica, di microscopia elettronica, colturali e biomolecolari quali la polymerase chain reaction (PCR) e la tecnologia dei micro-array su porzioni di tessuto vascolare (1-3, 8, 19). Nonostante ciò, resta tuttora controverso il ruolo di *C. pneumoniae* nel determinismo della lesione ateromasica e nell'evoluzione della placca ateromasica. A tale incertezza ha contribuito in modo particolare la non disponibilità di tecniche standardizzate responsabile della variabilità dei risultati finora ottenuti tra i laboratori. Più recentemente, alcune osservazioni hanno portato all'evidenza che una lesione aterosclerotica può evolvere in alcuni casi in modo rapidamente ingravescente con colliquazione endoteliale e stravasamento emorragico anche su placche apparentemente stabilizzate dal punto di vista istopatologico con calcificazione tissutale (13, 20).

Scopo della ricerca è stato:

- a) valutare alcune metodiche colturali e molecolari al fine di evidenziare la presenza di *C. pneumoniae* su campioni tissutali carotidei con evoluzione ed aspetti istopatologici differenti;
- b) effettuare mediante reverse-transcriptase (RT)-PCR un'analisi dell'espressione di geni specifici di *C. pneumoniae* che codificano per proteine coinvolte nei processi infiammatori al fine di definire il potenziale ruolo etiopatogenetico di questo microrganismo intracellulare.

MATERIALI E METODI

Abbiamo studiato un gruppo di 10 pazienti affetti da stenosi carotidea e sottoposti a resezione endoarteriosa dell'endotelio e della media della placca aterosclerotica. Ogni campione tissutale è stato suddiviso in tre porzioni: prossimale al cuore, corrispondente all'area tissutale apparentemente indenne a valle della placca; mediale, corrispondente alla placca, e distale, a monte della placca per un tratto di circa 5-15 mm.

Ogni porzione prelevata in condizioni aseptiche è stata immediatamente congelata a -80°C , quindi omogeneizzata e risospesa in PBS sterile. Aliquote di omogenato sono state impiegate per allestire colture per *C. pneumoniae* su linea cellulare Hep-2 in DMEM e siero fetale bovino 10% e da noi saggiare in altre esperienze (5). Aliquote di ciascun campione omogenato sono state inoltre sottoposte a lisi enzimatica per l'estrazione di DNA e RNA totale e quindi analizzate mediante PCR ed RT-PCR. Tali metodiche sono state anche impiegate su linee cellulari Hep-2 seminate con aliquote di tessuto arterioso omogenato. Sono stati studiati i geni 16S rRNA, *momp* e *hsp60* impiegando coppie di primers specie-specifici per *C. pneumoniae*. Per aumentare la specificità del metodo è stata applicata una nested PCR con tec-

nica *touchdown* in uno o in entrambi i cicli di amplificazione (4). Parallelamente, è stata eseguita negli stessi pazienti, la ricerca sierica di anticorpi IgG, IgM e IgA anti-*C. pneumoniae* (CP-Quant, Eurospital, Trieste, Italy). Sono stati considerati positivi i sieri che mostravano valori BU (Binding Units) >10 .

Cinque campioni di arteria carotide esenti da lesioni ateromatose ottenuti da esami autoptici sono stati usati come controllo.

RISULTATI

I risultati preliminari hanno messo in evidenza una positività per *C. pneumoniae* in 3/10 delle colture relative alle porzioni prossimali delle placche ed una concomitante negatività delle porzioni mediale e distale delle stesse. In un caso (S.E.) l'analisi mediante RT-PCR ha evidenziato una positività per il gene 16S di *C. pneumoniae* relativo alla porzione prossimale di arteria carotide interna con ulcera dell'intima; in un'altra paziente (F.I.) è stato risultato un segnale di amplificazione assai intenso per il gene *hsp60* di *C. pneumoniae* relativo al campione ottenuto dalla porzione prossimale di una placca carotidea ad evoluzione emorragica (Tabella 1; Figura 1).

In entrambi i casi sono state descritte complicanze (deficit scenico nel primo caso, tromboembolia retinica nel secondo caso) che hanno preceduto di 2-4 settimane l'intervento di endoarteriectomia resosi necessario per l'evidente evoluzione della placca ateromasica in senso ulcerativo o emorragico.

Le analisi mediante PCR e RT-PCR sulle colture cellulari hanno confermato i risultati ottenuti direttamente sui tessuti.

Il follow-up della paziente (F.I.) mediante ecocolor doppler dell'arteria carotide, a un mese dall'intervento di endoarteriectomia, ha evidenziato una neoformazione fibrosa intimale in sede prossimale, confermata invariata dopo due mesi dal termine di un trattamento con tetracicline.

Le analisi sierologiche effettuate hanno messo in evidenza titoli non elevati ($\text{BU} \geq 20$) di IgG anti-*C. pneumoniae* e assenza di IgM nei due pazienti risultati PCR-positivi e in tre pazienti PCR-negativi. Il dosaggio delle IgA specifiche anti-*C. pneumoniae* è tuttora in corso.

DISCUSSIONE

L'applicazione combinata delle indagini colturali e biomolecolari ha consentito un valido approccio per lo studio del ruolo di *C. pneumoniae* nell'etiopatogenesi delle lesioni tissutali aterosclerotiche.

Le metodologie da noi elaborate ed applicate su distinte porzioni delle lesioni tissutali da atero-

sclerosi (zone indenni, fibrotiche, calcifiche, ulcerative o emorragiche), hanno fornito un ulteriore contributo al chiarimento di una possibile associazione tra *C. pneumoniae* e danno tissutale aterosclerotico. Alcune recenti ricerche basate su analisi sierologiche hanno evidenziato un evidente legame tra elevati titoli anticorpali anti-Hsp60 umana e coronaropatia aterosclerotica (11).

In questa esperienza, l'impiego della RT-PCR si è dimostrato assai utile rispetto alle indagini convenzionali in quanto ha consentito di identificare le molecole realmente coinvolte nel danno immunopatologico dell'aterosclerosi. Interessante è risultata l'evidenza dell'espressione del gene *hsp60* di *C. pneumoniae* dal tessuto circostante la lesione ed apparentemente sano, in un caso (F.I.) con evoluzione acuta della placca carotidea ad impronta emorragica e preceduto da tromboembolia retinica.

La proteina Hsp60, essendo in grado di attivare fattori endoteliali, potrebbe essere responsabile dell'attivazione di processi infiammatori mediati da chemochine ed endoteline implicati nell'evoluzione dell'aterosclerosi e considerata, pertanto, un marcatore di attività non solo replicativa ma anche immunopatologica (14-15).

L'evidenza, in un caso (S.E.), di elevata espressione del gene 16S rRNA è indicativa di attiva replicazione di *C. pneumoniae* nell'endotelio arterioso. Altro dato importante emerso dalla presente ricerca è stato il riscontro di espressione genica di *C. pneumoniae* solo nell'endotelio della porzione prossimale apparentemente indenne

della placca ateromasica.

I risultati da noi ottenuti potrebbero essere correlabili alle osservazioni di carattere emodinamico che hanno evidenziato una prevalente distribuzione di macrofagi nelle porzioni prossimali dell'arteria dove sono più frequenti le rotture dell'intima e della media (6, 12).

Questi risultati sarebbero in parte attribuiti a un incremento della pressione arteriosa e ad una maggiore turbolenza del flusso rispetto a quanto si registra nella porzione distale dell'arteria carotide. Il riscontro di un aumento dei macrofagi nelle porzioni prossimali della placca potrebbe altresì confortare un possibile insulto infettivo, quale quello indotto da *C. pneumoniae*, che favorirebbe l'innescò di processi degenerativi dell'intima e della media ad evoluzione rapidamente ingravescente, in parte mediati dall'attività macrofagica di richiamo di citochine e chemochine con attività citopatogena.

Ulteriori dati potranno essere forniti dalle analisi molecolari sulle linee cellulari Hep-2 e sui rispettivi terreni di coltura, dall'analisi della produzione citochinica e di altri mediatori dell'infiammazione oltre che dal sequenziamento dei prodotti di amplificazione ottenuti dalla PCR e RT-PCR.

Lavoro realizzato in parte grazie a contributi PRIN 2005-2006, Fondazione CARIFE e CARICE 2005-2006

Tabella I. Risultati della RT-PCR su tessuto di arteria carotide secondo le porzioni prossimale (PROX), mediale (MED) e distale (DIST)

Pazienti	PROX		MED		DIST	
	coltura	RT-PCR	coltura	RT-PCR	coltura	RT-PCR
S.E.	+	+ 16S	-	-	-	-
F.I.	+	+ hsp-60	-	-	-	-

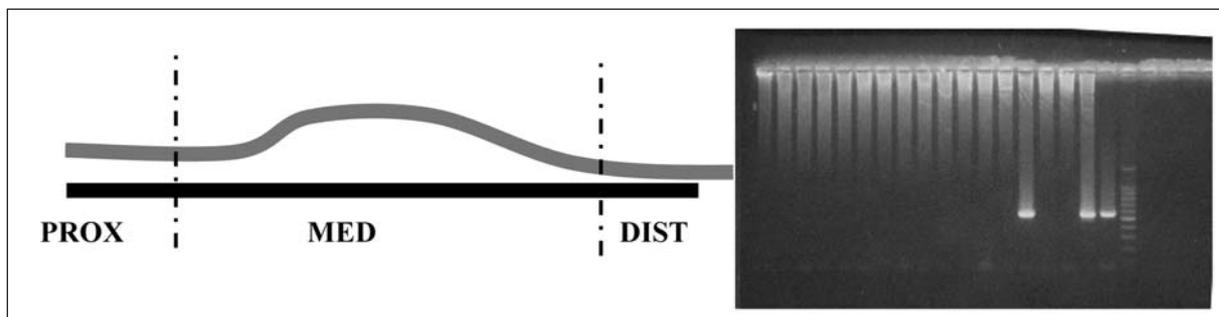


Figura I. A sinistra: rappresentazione schematica del frammento di endarteriectomia carotidea distinto nelle porzioni prossimale (PROX), mediale (MED) e distale (DIST) rispetto al cuore sottoposte ad analisi mediante PCR e RT-PCR per *C. pneumoniae*, previa omogeneizzazione e lisi per estrazione del materiale nucleotidico. A destra: gel elettroforesi dei prodotti di amplificazione di RT-PCR specifica per il gene *hsp60* di *C. pneumoniae* (564 bp). Linea 1: controllo negativo, linea 14: paziente F.I.; linee 17-18: controllo positivo *C. pneumoniae* AR-39; linea 19: markers 100 bp.

BIBLIOGRAFIA

1. Apfalter P, Blasi F, Boman J, et al. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens. *J Clin Microbiol*, 2001; 39: 519-24.
2. Boman J, Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15: 1-20.
3. Borel N, Mukhopadhyay S, Kaiser C, et al. Tissue MicroArray (TMA) analysis of normal and persistent *Chlamydia pneumoniae* infection. *BMC Infectious Diseases*, 2006; 6: 152-9.
4. Contini C, Cultrera R, Seraceni S, Castellazzi M, Granieri E, Fainardi E. Cerebrospinal fluid molecular demonstration of *Chlamydia pneumoniae* DNA is associated to clinical and brain magnetic resonance imaging activity in a subset of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple sclerosis*, 2004; 10: 360-9.
5. Contini C, Seraceni S, Giuliodori M, et al. Successful isolation of *Chlamydia pneumoniae* from synovial fluid and blood cultures of a patient with undifferentiated spondyloarthopathy. *Int J Infect Dis* 2006; abstr n. 35006.
6. Dirksen MT, van der Wal AC, van den Berg FM, van der Loos, Becker AE. Distribution of inflammatory cells in atherosclerotic plaques relates to the direction of flow. *Circulation*, 1998; 98: 2000-3.
7. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, et al. Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2002; 33: 2581-6.
8. Esposito G, Blasi F, Allegra L, et al. Demonstration of viable *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques of carotid arteries by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Ann Vasc Surg*, 1999; 13: 421-5.
9. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2006; 6: 508-519.
10. Higuchi Mde L, Reis MM, Sambiasi NV, et al. Coinfection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*, 2003; 81: 12-22.
11. Hoshida S, Nishino M, Tanouchi J, Kishimoto T, Yamada Y. Acute *Chlamydia pneumoniae* infection with heat shock protein 60-related response in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*, 2005; 183: 109-12.
12. Imbesi SG, Kerber CW. Why do ulcerated atherosclerotic carotid artery plaques embolize? A flow dynamics study. *Am J Neuroradiol*, 1998; 19: 761-6.
13. Koenig W, Khusyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27: 15-26.
14. Kol A, Libby P. The mechanisms by which infectious agents may contribute to atherosclerosis and its clinical manifestations. *Trends Cardiovasc Med*, 1998; 8: 191-9.
15. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*, 1998; 98: 300-7.
16. Krayenbuehl P, Wiesli P, Maly FE, Vetter W, Shulthess G. Progression of peripheral arterial occlusive disease is associated with *Chlamydia pneumoniae* seropositivity and can be inhibited by antibiotic treatment. *Atherosclerosis*, 2005; 179: 103-10.
17. Kuroda S, Kobayashi T, Ishii N, et al. Role of *Chlamydia pneumoniae*-infected macrophages in atherosclerosis developments of the carotid artery. *Neuropathology*, 2003; 23: 1-8.
18. Vainas T, Kurvers HAJM, Mess WH, et al. *Chlamydia pneumoniae* serology is associated with thrombosis-related but not with plaque-related microembolization during carotid endarterectomy. *Stroke*, 2002; 33: 1249-54.
19. Valassina M, Migliorini L, Sansoni A, et al. Search of *Chlamydia pneumoniae* genes and their expression in atherosclerotic plaques of carotid arteries. *J Med Microbiol*, 2001; 50: 228-32.
20. Virmani R, Ladich ER, Burke AP, Kolodgie FD. Histopathology of carotid atherosclerotic disease. *Neurosurgery*; 59 (suppl 3): S219-227.
21. Weiss TW, Kvakan H, Kaun C, et al. No evidence for a direct role of *Helicobacter pylori* and *Mycoplasma pneumoniae* in carotid artery atherosclerosis. *J Clin Pathol*, 2006; 59: 1186-90.
22. Zhu J, Nieto J, Horne BD, Anderson JL, Muhlestein JB, Epstein SE. Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. *Circulation*, 2001; 103: 45-51.

Rosario Cultrera

Sezione di Malattie Infettive
 Dipartimento di Medicina Clinica e
 Sperimentale
 Università degli Studi di Ferrara
 Via Fossato di Mortara, 23
 44100 Ferrara
 Tel./Fax: +39 0532 291391
 E-mail: ctr@unife.it