

*Michał Walski\**, *Lidia Chomicz\*\**, *Julia Dąbrowska\*\*\**, *Justyna Żebrowska\*\**,  
*Tomasz Dudziński\*\**

**CHLAMYDIA PNEUMONIAE - GROŹNY CZYNNIK BIOLOGICZNY  
WSPÓŁODPOWIEDZIALNY ZA PATOLOGICZNE ZMIANY W ŚCIANACH  
TĘTNIC LUDZKICH W PROCESACH MIAŻDŻYCOWYCH**

\* Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie

Dyrektor Instytutu: Zbigniew Czernicki

\*\* Zakład Biologii Medycznej AM w Warszawie

Kierownik Zakładu: Lidia Chomicz

\*\*\* Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii AM w Warszawie

Kierownik Zakładu: Barbara Grytner-Zięcina

*W pracy zreferowano wyniki badań dotyczących patogenezы zmian miażdżycowych w ścianach tętnic szyjnych. Analiza materiału otrzymanego śródoperacyjnie, dokonana przy użyciu technik mikroskopii elektronowej umożliwiła ocenę - na poziomie subkomórkowym - współodpowiedzialności zróżnicowanych form bakteryjnych patogenów Chlamydia pneumoniae w procesie miażdżycowym.*

*Słowa kluczowe: chlamydie, ultrastruktura, miażdżyca tętnic szyjnych, patogenezа*

*Key words: Chlamydia, ultrastructure, human carotid atherosclerosis, pathogenesis*

## WSTĘP

Na obecnym etapie wiedzy uważa się, że proces miażdżycowy naczyń krwionośnych spowodowany jest przewlekłym stanem zapalnym (1, 2). Nadal jednak nie są dokładnie poznane mechanizmy procesu zapalnego prowadzące do powstania blaszki miażdżycowej, a w konsekwencji powodujące przebudowę ściany naczynia. Dysfunkcja komórek śródbłonkowych jest uważana za odgrywającą kluczową rolę w formowaniu i progresji płytek miażdżycowych. Pojęcie dysfunkcji śródbłonek powstało w oparciu o wyniki badań biochemicznych, natomiast rozważania morfologiczne dotyczące tego zagadnienia są bardzo nieliczne (3). Niemniej jednak obecnie najczęściej w piśmiennictwie porusza się aspekt uszkodzenia śródbłoneka na drodze zaburzonej hemodynamiki lub oddziaływania patogenów o charakterze pasożytniczym (3, 4). Zakażenia bakteryjne oraz wirusowe i towarzysząca im odpowiedź zapalna prowadzą do uszkodzenia komórek śródbłonkowych. Następnie patogeny wnikają w głąb ściany naczynia doprowadzając do jej przebudowy poprzez poliferację komórek warstwy wewnętrznej.

W ostatnich latach udowodniono związek zakażeń *Chlamydia pneumoniae* i innych czynników infekcyjnych z procesami miażdżycowymi w naczyniach wieńcowych i tętnicach szyjnych (5, 6, 7). *Chlamydia pneumoniae* zalicza się do pasożytów wewnątrzkomórkowych, pozbawionych zdolności do syntezy własnego ATP (8). Pozostaje nadal pytanie dotyczące mechanizmów, za pomocą których drobnoustroj ten wpływa na przebieg procesu miażdżycowego.

Celem naszych badań było zobrazowanie zmian morfologicznych na poziomie rozdzielczości mikroskopu elektronowego, w zmienionych miażdżycowo ścianach ludzkich tętnic szyjnych. Analiza dotyczyła powierzchni komórek śródbłonkowych oraz elementów morfotycznych wewnętrznej warstwy zmienionej tętnicy w toczącym się procesie miażdżycowym.

### MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań pobrano śródoperacyjnie ze zmian miażdżycowych, zlokalizowanych w ludzkich tętnicach szyjnych, na drodze aterekтомii. U 8 pacjentów w wieku od 58 do 72 lat, wykryto DNA *Chlamydia pneumoniae* za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Materiał tkankowy utrwalono do badań mikroskopowo-elektronowych w 2,5-procentowym glutaraldehydzie i 2-procentowym paraformaldehydzie, a następnie dotrwalono w tlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) z dodatkiem cyjanku żelazowo-potasowego ( $\text{K}_4\text{FcCN}_6$ ). Materiał przygotowywano do badań w mikroskopie elektronowym skaningowym i transmisyjnym, jak to przedstawiono w uprzednich pracach (7, 10).

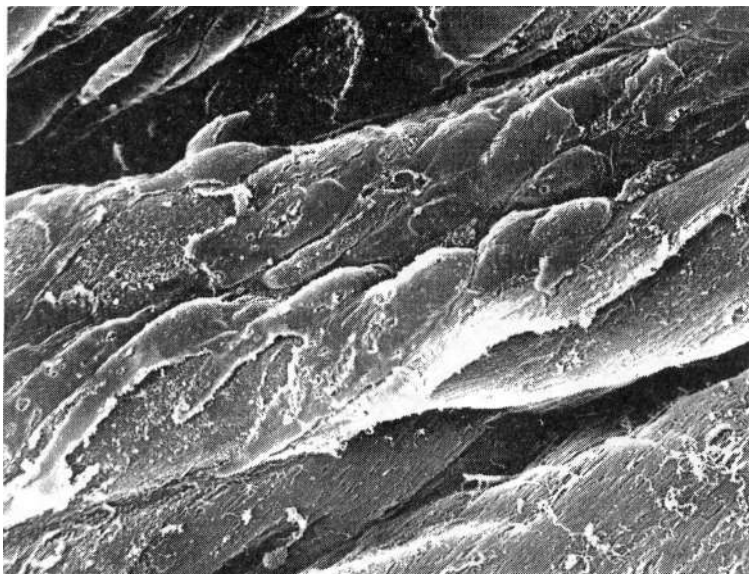
### WYNIKI

Uzyskane informacje o strukturze przebudowanej miażdżycowo ściany ludzkiej tętnicy szyjnej dotyczą powierzchni komórek śródbłonkowych oraz budowy wewnętrznej elementów składowych tego naczynia.

Techniką mikroskopii elektronowej skaningowej zobrazowano najbardziej wewnętrzną warstwę tętnicy, którą stanowią komórki śródbłonkowe. Komórki te tworzyły wyściółkę, która nic zawsze zachowywała swoją morfologiczną ciągłość.

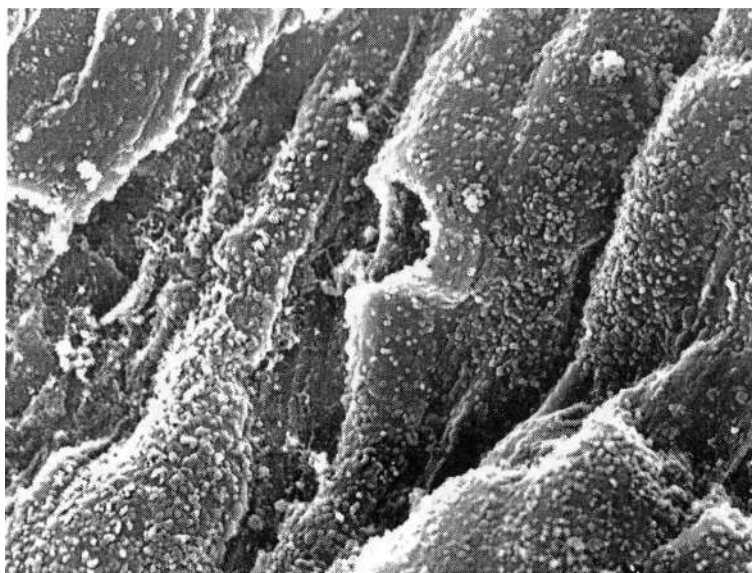
W miejscach uszkodzeń wyściółki widoczne były odsłonięte, leżące pod nią elementy łącznotkankowe (ryc. 1). Na wolnej powierzchni komórek śródbłonkowych zaobserwowano formacje morfologiczne przypominające mikrokosmki. Do wielu z tych formacji przylegały upostaciowane elementy krwi oraz włókienka wykrzepionego włókniaka. Niekiedy w błonie komórki śródbłonka znajdowały się regularne otwory, od których biegnęły kanały w głąb komórek śródbłonkowych (ryc. 2).

Za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego oceniono warstwę środkową ściany badanych naczyń. Pod śródbłonkiem stwierdzono obecność łącznotkankowych elementów włóknistych: włókienek elastynowych i kolagenowych, między którymi występowały bardzo zróżnicowane makrofagi. Komórki te obciążone były licznymi kulami tłuszczowymi oraz fagolizosomami, w których wnętrzu znajdowały się koncentrycznie nawinięte błony lipidowe (ryc. 3). W tej części tętnic szyjnych najliczniejsze były komórki mięśni gładkich. Tworzyły one rozbudowaną sieć utworzoną z licznych proliferujących wypustek plazmatycznych. We wnętrzu tych komórek znajdowały się wielopłatowate jądra, kanały siateczki śródplazmatycznej oraz mitochondria (ryc. 4).



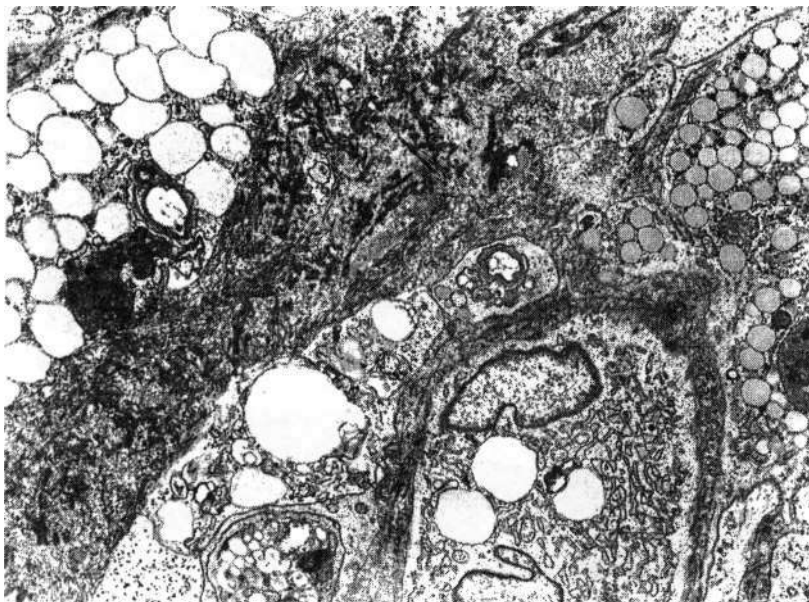
Ryc. 1. Powierzchnia ściany naczynia z uszkodzonymi komórkami śródbłonkowymi - mikroskop elektronowy skaningowy (SEM) (x 2000)

Fig. 1. Scanning electron micrograph (SEM) showing structure of artery wali with alterations of endothelial cells SEM (x 2000)



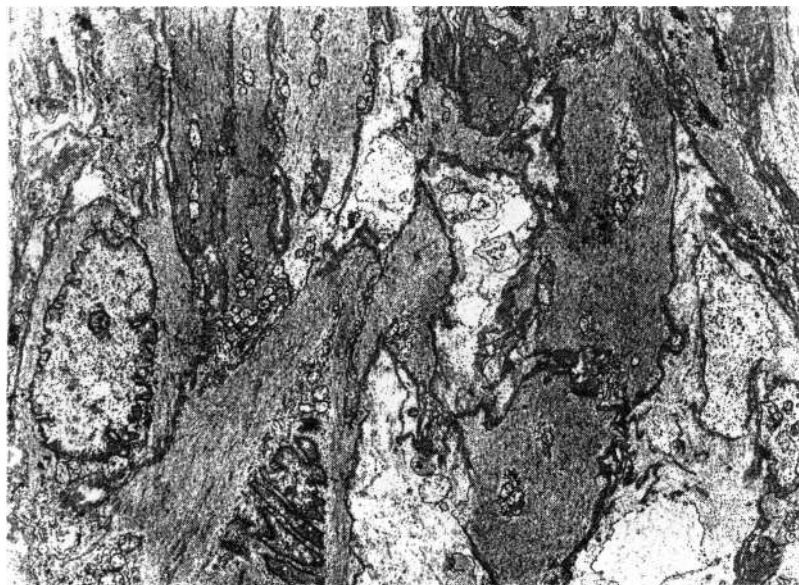
Ryc. 2. Powierzchnia komórek śródbłonka wyściełającego zmienione miażdżycowo naczynie z widocznymi licznymi mikrokosmkami, z przylegającymi składnikami krwi oraz otworami prowadzącymi w głąb ściany naczynia. SEM (x 6000)

Fig. 2. Surface of endothelial cells with „microvilli”, adherent blood cells and canals in artery wali. SEM (x 6000)



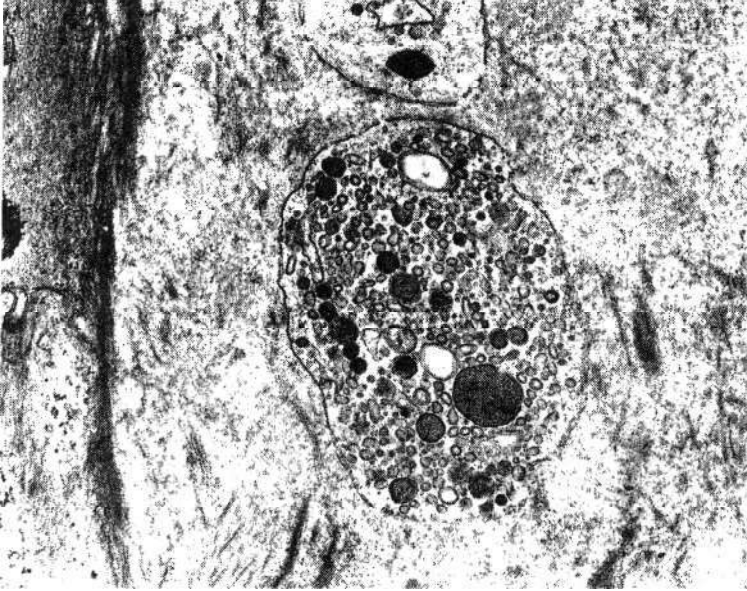
Ryc. 3. Pod warstwą śródbłonna widoczne liczne makrofagi obciążone lipidami. Mikroskop elektronowy transmisyjny (TEM) (x 6000x)

Fig. 3. Numerous macrophages filled with lipids under endothelial layer. Transmission electron micrograph (TEM) (x 6000x)



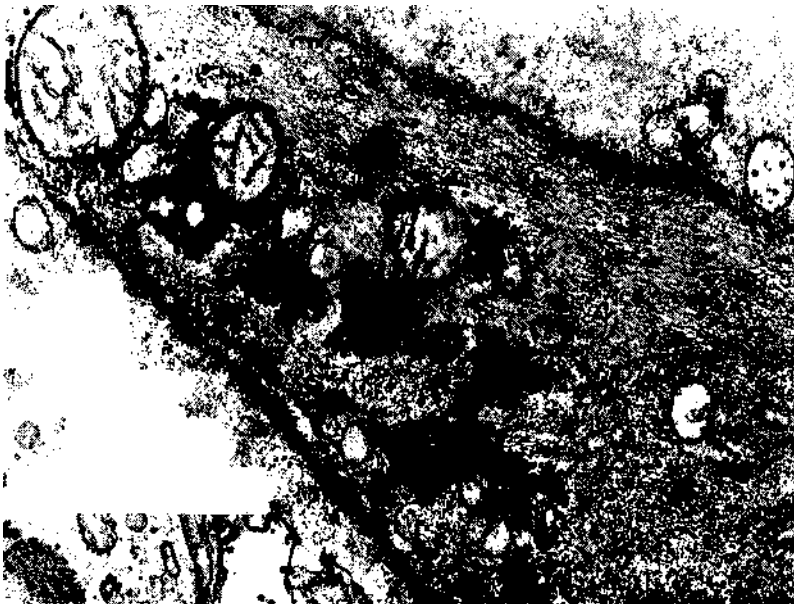
Ryc. 4. Rozgałęzione komórki mięśni gładkich w warstwie środkowej ściany naczyniowej. TEM (x 5000)

Fig. 4. Branched smooth muscles cells within middle layer of artery wali. TEM (x 5000)



Ryc. 5. *Chlamydia pneumoniae* - liczne ciała elementarne w sąsiedztwie mitochondriów we wnętrzu komórki mięśniowej gładkiej. TEM (x 30 000)

Fig. 5. Numerous elementary bodies of *Chlamydia pneumoniae* and mitochondrion within muscle cells. TEM (x 30 000)



Ryc. 6. *Chlamydia pneumoniae* - ciała retikularne w ścianie tętnicy szyjnej. TEM (x 15 000)

Fig. 6. Reticular bodies of *Chlamydia pneumoniae* inside artery wall. TEM (x 15 000)

W cytoplazmie komórek mięśniowych występowały zróżnicowane morfologicznie formy *Chlamydia pneumoniae*, jako tak zwane ciała retikularne oraz ciała elementarne.

Ciała retikularne miały bardzo nieregularny, owalny kształt. Otoczone były podwójną błoną, a niekiedy w ich wnętrzu znajdował się elektronowo gęsty rdzeń. Występowały one nie tylko we wnętrzu komórek mięśniowych, ale także w przestrzeniach międzykomórkowych, niekiedy otoczone wspólną błoną (ryc. 5).

Elektronowo gęste ciała elementarne chlamydii były mniejszymi formami niż ciała retikularne. Struktury te tworzyły agregaty przylegające do błon mitochondrialnych (ryc. 6). Zaobserwowano również pojedyncze ciała elementarne w przestrzeni międzykomórkowej, wśród włókienek łącznotkankowych.

## DYSKUSJA

Obecnie uważa się, że tworzenie się blaszki miażdżycowej w naczyniach tętniczych spowodowane jest trwałym lub przejściowym uszkodzeniem śródbłonka czynnikami mechanicznymi, toksycznymi lub drobnoustrojami (3, 9). Uszkodzone komórki śródbłonkowe umożliwiają adhezję do ściany naczyniowej płytek krwi, elementów białokrwinkowych, a następnie ich penetrację w głąb ściany. Jak dowodzą uzyskane przez nas dane, w ten sposób są pasażowane również bakterie z rodzaju *Chlamydia*. Odgrywają one istotną rolę w toczącym się procesie miażdżycowym (4, 7). Elektronogramy skaningowe jednoznacznie wykazują, w jakim zakresie dochodzi do uszkodzenia bariery śródbłonkowej w toczącym się procesie chorobowym. Potwierdza to nasze wcześniejsze obserwacje, że zróżnicowana powierzchnia śródbłonek, tworząca system mikrokosmków, jak również powstałe kanały prowadzące w głąb ściany naczynia, reprezentują ultrastrukturalne podłoże dysfunkcji śródbłonka (10). Dysfunkcja śródbłonka otwiera drogę do łatwego przemieszczania się monocytów do warstwy wewnętrznej tętnicy, a następnie transformacji tych komórek do makrofagów piankowatych (11). Te ostatnie uwalniają metaloproteinazy, niszczące zrąb łącznotkankowy i powodujące proliferację mięśniówki gładkiej (12). Makrofagi te mogą transportować chlamydie do wnętrza ściany naczynia. Największe zgrupowanie zróżnicowanych morfologicznie form tych bakterii autorzy zaobserwowali w komórkach mięśniowych. Korzystają one nie tylko z energii generowanej przez komórki gospodarza, ale są też nośnikami lipopolisacharydu, który stymuluje makrofagi do wydzielania czynników zapalnych (7, 9, 13). Uważamy za niekwestionowany udział *Chlamydia pneumoniae* w aterogenności tętnic szyjnych i wieńcowych.

## WNIOSKI

Na podstawie wyników naszych badań mikroskopowo-elektronowych można stwierdzić, że:

1. Podczas toczącego się procesu miażdżycowego w tętnicach szyjnych dochodzi do uszkodzenia wyściółki śródbłonkowej.
2. Odsłonięcie warstwy wewnętrznej ściany naczynia powoduje wnikanie komórek zapalnych oraz bakterii z gatunku *Chlamydia* w głąb ściany komórkowej.
3. Czynniki wydzielane przez komórki zapalne, jak również wykryte *Chlamydia pneumoniae*, doprowadzają do patologicznej przebudowy komórek ściany naczyń.

Uzyskane przez nas dane ultrastrukturalne wyraźnie dowodzą, że *Chlamydia pneumoniae* stanowi groźny czynnik biologiczny, współodpowiedzialny za patologiczne zmiany w ścianach tętnic ludzkich w procesach miażdżycowych.

M Walski, L Chomicz, J Dąbrowska, J Żebrowska, T Dudziński

CHLAMYDIA PNEUMONIE AS A BIOLOGICAL FACTOR CONTRIBUTING  
IN PATHOLOGICAL CHANGES OF ARTERIAL WALL IN PATIENTS  
WITH ATHEROSCLEROSIS

SUMMARY

In this study, using scanning and transmission electron microscope, we attempt to evaluate ultrastructural alterations of endothelial cells, macrophages and smooth muscles cells. The inflammatory process has an essential impact on the development of *Chlamydia* infection.

Specimens from human carotid were obtained from patients who underwent endarterectomy. For examination under scanning and transmission electron microscope vessel sections were fixed in paraformaldehyde and glutaraldehyde.

We analysed alterations of endothelial cells covering advanced atherosclerotic plaque in carotid using scanning electron microscope. Smooth muscles cells had undergone the heaviest proliferation among the cells on artery wall. In the tested material we detect diversified morphological forms of *Chlamydia sp.*

We found that one of the pathogens that may lead to atherosclerotic lesions is *Chlamydia pneumoniae*.

PIŚMIENNICTWO

1. Blankenhorn DH, Hodis HN. Arterial imaging and atherosclerosis reversal, *Arterioscler Thromb* 1994;14:177-92.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993;362:801-9.
3. Dexler H, Horning B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:51-60.
- Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-9.
5. Walski M, Podsiadły P, Walczak E, et al: The presence of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques - a report of three cases of ischaemic heart disease. *Pol J Pathol* 1999;50:93-7.
6. Markus HS, Sitzer M, Carrington D, et al: *Chlamydia pneumoniae* infection and early asymptomatic carotid atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:832-7.
7. Walski M, Łazowski T, Szostek M, et al: Electron microscope investigation of the role of *Chlamydia sp.* in the process of rebuilding the arterial wall. Neoangiogenesis in atherosclerotic plaques in human cervical artery walls. *Med Sci Monit* 2002;8:BR 30-8.
8. Chrapusta SJ, And Walski M. Tatrogenic Chlamydia infection - associated damage in the basilar arterial wali of the rat. *Folia Histochem Cytobiol* 2002;40:53-5.
9. Ward ME. The immunobiology and immunopathology of chlamydial infections. *APMIS* 1995;103:769-96.
10. Walski M, Chlopicki S, Celary-Walska R, et al: Ultrastructural alterations of endothelium covering advanced athelosclerotic plaque in human carotid artery visualised by scanning electron microscope. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53:713-23.

11. Taylor KE, Głagor S, Zarins CK. Preservation and structural adaptation of endothelium over experimental foam cell lesions. Quantitative ultrastructural study. *Atherosclerosis* 1989;9:881-94.
12. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Cir Res* 2001;89:763-71.
13. Markus HS. *Chlamydia pneumoniae* infection and early asymptomatic carotid atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:832-7.

**Adres autorów:**

Lidia Chomicz  
Zakład Biologii Medycznej AM  
ul. Nowogrodzka 73, 02-018 Warszawa