

МИКРОБНЫЙ ПЕЙЗАЖ БИОПТАТОВ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК

Диляра Магсумовна Шарифуллина^{1*}, Рита Мирзариповна Васильева¹,
Татьяна Ивановна Яковлева¹, Елена Геннадьевна Николаева¹, Оскар Кимович Поздеев^{2,3},
Андрей Петрович Ложкин¹, Рустем Наилевич Хайруллин¹

¹Межрегиональный клинико-диагностический центр, г. Казань, Россия;

²Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

³Казанская государственная медицинская академия, г. Казань, Россия

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-979

Цель. Исследовать состав микрофлоры атеросклеротических бляшек различной локализации у больных атеросклерозом сосудов.

Методы. Проанализировано 88 образцов атеросклеротических бляшек, в том числе брахицефальных артерий – 71, коронарных артерий – 13, аорты – 2, сосудов нижних конечностей – 2. Материал был отобран у 71 мужчины и 17 женщин в возрасте 30–79 лет (средний возраст 50,8 года). Присутствие аэробной и анаэробной микрофлоры определяли бактериологическим методом. Выявление нуклеиновых кислот цитомегаловируса, вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, вируса Эпштейна–Барр осуществляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Наиболее разнообразная микрофлора была представлена в бляшках из сосудов шеи (сонных артерий). В них мы обнаружили бактерии в 77,5% образцов, в том числе *Propionibacterium acnes* – в 40,8%, рода *Staphylococcus* – в 50,7%, из которых 83,3% изолятов было идентифицировано как *S. epidermidis*. В 14,1% образцов бляшек из брахицефальных артерий были обнаружены ассоциации микроорганизмов (*P. acnes* и *S. epidermidis*). В бляшках из коронарных артерий и аорты микрофлора была представлена исключительно только *P. acnes* – 15,4 и 50% соответственно. Нуклеиновые кислоты вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов, Эпштейна–Барр обнаружены в 6,7% образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий. Ассоциации бактерий присутствовали исключительно в атеросклеротических бляшках из брахицефальных артерий – в 11,4% образцов, в том числе 9 ассоциаций из бактерий (*P. acnes* и *S. epidermidis*) и одна ассоциация состояла из 3 микроорганизмов: 2 видов бактерий (*P. acnes* и *S. epidermidis*) и вируса Эпштейна–Барр.

Вывод. Установленная высокая частота обнаружения микроорганизмов в изученных образцах атеросклеротических бляшек позволяет предположить их возможное патогенетическое значение в формировании атеросклеротических повреждений эндотелия сосудов.

Ключевые слова: биоптаты атеросклеротических бляшек, микрофлора, *P. acnes*, *S. epidermidis*.

MICROBIAL LANDSCAPE OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUES BIOPSY SAMPLES

D.M. Sharifullina¹, R.M. Vasil'eva¹, T.I. Yakovleva¹, E.G. Nikolaeva¹, O.K. Pozdееv^{2,3}, A.P. Lozhkin¹, R.N. Khayrullin¹

¹Interregional Clinical Diagnostic Center, Kazan, Russia;

²Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

³Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

Aim. To study the microflora composition of different localization atherosclerotic plaques in patients with atherosclerosis.

Methods. 88 samples of atherosclerotic plaques were analyzed, including brachycephalic arteries – 71, the coronary arteries – 13, the aorta – 2, vessels of lower extremities – 2. The specimens were obtained from 71 men and 17 women aged 30–79 years (mean age 50.8 years). The presence of aerobic and anaerobic microflora was determined by bacteriological method. Detection of the cytomegalovirus nucleic acid, herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein–Barr virus was performed by real time polymerase chain reaction.

Results. The most diverse microflora was represented in the plaques of the neck vessels (carotid arteries). Thereat we found bacteria in 77.5% of the samples, including *Propionibacterium acnes* – 40.8%, the *Staphylococcus* genus – 50.7%. 83.3% *Staphylococcus* isolates were identified as *S. epidermidis*. In 14.1% of the samples from the brachycephalic artery plaques microorganisms associations (*P. acnes* and *S. epidermidis*) were found. The coronary arteries and aorta plaques microflora was represented entirely by *P. acnes* – 15.4 and 50% respectively. *Herpes simplex* virus type 1 and 2, and Epstein–Barr virus nucleic acids were detected in 6.7% of samples of carotid artery atherosclerotic plaques. Bacteria associations were presented exclusively in atherosclerotic plaques from brachycephalic arteries – 11.4% of the samples, including 9 bacteria (*P. acnes* and *S. epidermidis*) associations, and one association consisted of 3 microorganisms: 2 bacteria (*P. acnes* and *S. epidermidis*) and the virus (Epstein–Barr virus).

Conclusion. Observed high frequency of microorganisms detection in studied atherosclerotic plaques samples allows to suggest their possible pathogenetic role in the blood vessels endothelium atherosclerotic lesions formation.

Keywords: atherosclerotic plaque biopsy, microflora, *P. acnes*, *S. epidermidis*.

До настоящего времени «белым пятном» остаётся проблема установления единой концепции развития атеросклероза. К настоящему времени известно не менее 20 теорий атерогенеза, раскрывающих, однако, лишь отдельные стороны единого метабо-

лического каскада. На протяжении последних десятилетий предметом дискуссии является роль микробного фактора в развитии атеросклероза. Существуют прямые предположения, что заболевание – следствие медленно развивающейся инфекционной макроангиопатии, отягощённой гиперхолестеринемией [4]. К настоящему времени

Результаты диагностики микрофлоры атеросклеротических бляшек различных локализаций бактериологическим методом

Категория сосудов	Количество биоптатов атеросклеротических бляшек	Из них положительных проб		В том числе микрофлора					
				<i>Propionibacterium acnes</i>		<i>Staphylococcus spp.</i>		Ассоциации	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Сосуды шеи	71	55	77,5	29	40,8	36	50,7	10	14,1
Коронарные артерии	13	2	15,4	2	15,4	0		0	
Аорта	2	1	50,0	1	50,0	0		0	
Периферические артерии	2	0		0		0		0	
Итого	88	58	65,9	32	36,4	36		10	11,4

опубликовано достаточно много сообщений об обнаружении в атеросклеротических бляшках (АБ) широкого спектра микроорганизмов: *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, видов *Pseudomonas*, *Propionibacterium* и *Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, вирусов герпеса человека 1-го, 3-го и 4-го типов и др. [5, 6, 12]. При этом получены данные о присутствии в АБ ассоциаций микроорганизмов [10, 13, 15].

В связи с этим представляло интерес изучение состава микрофлоры АБ различной локализации у больных атеросклерозом сосудов, поступивших в ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр МЗ РТ» в г. Казани.

Исследовано 88 образцов АБ, полученных во время проведения каротидной эндартерэктомии, аортокоронарного и бедренно-подколенного шунтирования, аортобифemorального протезирования пациентам с атеросклерозом сосудов. Материал был отобран у 71 мужчины и 17 женщин в возрасте 30–79 лет (средний возраст 50,8 года). Пациенты не принимали антибактериальные препараты в течение нескольких дней до процедуры отбора пробы.

Были исследованы биоптаты АБ, полученные из аорты (2), коронарных артерий (13), сосудов нижних конечностей (2) и сонных артерий (71). Отбор образцов выполняли в операционных с вертикальным ламинарным потоком воздуха. Все биоптаты разделяли на два фрагмента. Третий фрагмент биоптата отобрали у 20 образцов для последующего исследования с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). Как отрицательный контроль на этапе выемки образца АБ в качестве «манекена бляшки» на стол в операционной комнате на весь период извлечения АБ выкладывали стерильную марлевую салфетку. Фрагмент «манекена» впоследствии помещали в среду для контроля стерильности и доставляли в

лабораторию совместно с образцами АБ от пациентов.

Первый фрагмент биоптата размером 1–2 см помещали в сухую стерильную ёмкость и немедленно доставляли в лабораторию, где проводили прямой посев на твёрдую питательную среду – основу кровяного агара (Pronadisa, Испания) с добавлением 5% крови барана. Технология посева заключалась в нанесении отпечатков кусочком биоптата по поверхности питательной среды в сочетании с штриховым рассевом с помощью микробиологической петли. Посевы на кровяном агаре инкубировали 2 сут при 35 °С в CO₂-инкубаторе марки MCO 15AC (SANYO, Япония). При наличии роста колоний на твёрдых питательных средах идентификацию аэробных культур проводили с помощью наборов МИКРО-ЛА-тест (Лахема, Чехия).

Второй фрагмент АБ погружали в стерильную пробирку с жидкой тиогликолевой средой (Himedia, Индия), доставляли в лабораторию и помещали в термостат при 35 °С. Посевы просматривали ежедневно в течение 60 сут. При появлении в пробирках видимых признаков роста проводили пересев на кровяной агар и агар Шедлера (Pronadisa, Испания) с 5% дефибрированной кровью барана. Посевы инкубировали 48 ч при 35 °С в аэробных и анаэробных условиях соответственно. При наличии роста на плотных средах проводили идентификацию аэробных культур, как указано выше. Анаэробные культуры идентифицировали с помощью наборов АНАЭРОтест (Лахема, Чехия).

Образец «манекен бляшки» исследовали аналогично и параллельно со вторым фрагментом АБ, то есть погружали в стерильную пробирку с жидкой тиогликолевой средой (Himedia, Индия), доставляли в лабораторию и помещали в термостат при 35 °С. Посевы просматривали ежедневно в течение

Результаты диагностики вирусного спектра атеросклеротических бляшек различных локализаций при помощи полимеразной цепной реакции

Категория сосудов	Количество биоптатов атеросклеротических бляшек	Из них положительных проб		В том числе ДНК вирусов					
				<i>Citomegalovirus</i>		<i>Epstein-Barr virus</i>		<i>Herpes simplex virus 1, 2</i>	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Сосуды шеи	15	2	13,3	0		1	6,7	1	6,7
Коронарные артерии	2	0		0		0		0	
Аорта	1	0		0		0		0	
Периферические артерии	2	0		0		0		0	
Итого	20	2	10,0	0		1	5,0	1	5,0

60 сут. При обнаружении положительного роста в образце с манекеном проводили выбраковку результатов исследования фрагментов биоптата АБ №1 и №2.

Третий фрагмент АБ (20) помещали в микропробирки типа «Эппендорф» и немедленно доставляли в лабораторию для идентификации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) методом ПЦР. Для выделения ДНК использовали набор «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Постановку ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе с оптическим модулем iCycler iQ5 (BioRad, Франция) с применением наборов реагентов CMV-FRT, Herpes simplex virus 1, II-FRT, EBV-скрин-титр (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Результаты изучения микрофлоры АБ различных локализаций представлены в табл. 1.

Результаты микробиологического исследования АБ показали, что эти локусы организма человека не являются стерильными. Наиболее разнообразная микрофлора была представлена в АБ из сосудов шеи (сонных артерий). В них мы обнаружили бактерии в 77,5% образцов, в том числе *Propionibacterium acnes* – в 40,8%, рода *Staphylococcus* – в 50,7%, из которых 83,3% изолятов было идентифицировано как *S. epidermidis*. В 10 образцах АБ из брахицефальных артерий были обнаружены ассоциации микроорганизмов, представленные *P. acnes* и *S. epidermidis* (14,1%). В образцах АБ из коронарных артерий и аорты микрофлора была представлена исключительно только *P. acnes*. Частота обнаружения *P. acnes* в АБ из коронарных артерий – 15,4% (2/13), из брюшного отдела аорты – 50% (1/2).

Результаты исследования микрофлоры 20 образцов АБ методом ПЦР показали наличие вирусной ДНК только в биоптатах АБ из брахицефальных артерий: 6,7% из них – ДНК вируса Эпштейна-Барр, а

также вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов (табл. 2). В одном образце АБ из сонной артерии была установлена ассоциация, состоящая из 3 микроорганизмов: 2 видов бактерий (*P. acnes* и *S. epidermidis*) и вируса Эпштейна-Барр.

Все существующие в настоящее время теории атерогенеза укладываются в рамки двух концепций: липидно-инфильтрационной и обусловленной изменениями клеточных, соединительнотканых и других структур артериальной стенки, не являющимися взаимоисключающими. В качестве одного из пусковых факторов обе эти концепции рассматривают развитие локальной воспалительной реакции. Последняя, в том числе, может быть индуцирована микроорганизмами, что подтверждает их обнаружение в АБ [14] и антител к ним в сыворотке крови больных [1]. Указанное подтверждают и результаты экспериментального заражения лабораторных животных, predisposing к развитию атеросклероза [12].

Можно полагать, что циркуляция бактерий в ходе частых случаев бессимптомных бактериемий сопровождается их адгезией на эндотелии. В ответ эндотелиоциты выделяют провоспалительные цитокины, стимулирующие хемотаксис фагоцитов, с последующим образованием ксантомных (пенистых) клеток, характерных для начальных стадий атеросклероза.

В исследованных нами биоптатах АБ обнаружены изоляты *P. acnes* и *S. epidermidis*. Эти данные коррелируют с данными, полученными ранее. В частности, О. Koren и соавт. (2011) установили присутствие пропионибактерий в 61,5% случаев (в 8 из 13 образцов АБ) и стафилококков – в 15,4% случаев (в 2 из 13 образцов) [10]. Аналогичные результаты были получены В. Rafferti и соавт. [13], обнаружившими присутствие в АБ изолятов *P. acnes*, *S. epidermidis*, *Streptococcus infantis* и *Porphyromonas gingivalis*.

В нашем исследовании *P. acnes* выделены в 36,4% случаев (в 32 АБ из 88), а *S. epidermidis* — в 40,9% изученных АБ (в 36 из 88). Известно, что эти бактерии — комменсалы, но также способны вызывать широкий спектр заболеваний у человека, в том числе поражения сердечно-сосудистой системы [7]. Кроме того, пропионибактерии способны стимулировать синтез провоспалительных цитокинов (интерферона γ , интерлейкинов-1 α , -6, -12, -8, фактора некроза опухоли альфа), способных играть существенную роль, в том числе и в поражении эндотелия сосудов. С другой стороны, бактерии синтезируют сиалидазу [3], позволяющую *P. acnes* утилизировать сиаловую кислоту в качестве источника энергии.

Помимо бактерий, многочисленные исследования предполагают участие в атерогенезе и различных герпесвирусов [5, 8]. К настоящему времени получены весомые доказательства участия цитомегаловируса и вируса простого герпеса 1-го типа в патогенезе подобных поражений F. Gyorkey и соавт. (1984), В. Chiu (1999), S. Tremolada и соавт. (2011) [6, 2, 15].

В наших исследованиях показано присутствие ДНК вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов в 6,7% образцов АБ сонных артерий, что согласуется с данными В. Chiu (1999), обнаружившего ДНК вируса в 10,5% (8 из 76) изученных образцов [2]. Однако нам не удалось обнаружить ДНК цитомегаловируса в изученных образцах АБ, хотя её присутствие зафиксировано исследованиями В. Chiu (1999) и М. Izadi (2012) [2, 9]. Наши данные согласуются с результатами исследования S. Tremolada и соавт. (2011) [15], которым, так же как и нам, не удалось зарегистрировать присутствие ДНК цитомегаловируса в АБ, но в то же время они обнаружили ДНК вируса Эпштейна-Барр в АБ из сонных артерий в 17,3% (3 из 17) случаев.

ВЫВОД

Установленная высокая частота обнаружения микроорганизмов в изученных образцах АБ позволяет предположить их возможное патогенетическое значение в

формировании атеросклеротических повреждений эндотелия сосудов, в том числе через деацетилизацию липопротеинов низкой плотности. Более детальное изучение этиологической значимости микробного фактора в формировании атеросклеротических бляшек требует проведения дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Buja L.M. Does atherosclerosis have an infectious etiology? *Circulation*. 1996; 94: 872–873.
2. Chiu B. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am. Heart. J.* 1999; 138 (5, pt. 2): 534–536.
3. Christensen G., Bruggemann H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes*. 2014; 1 (5, pt. 2): 201–215. DOI: 10.3920/BM2012.0062.
4. Ellis R.W. Infection and coronary heart disease. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46 (7): 535–539.
5. Fabricant C.G., Fabricant J., Litrenta M.M., Minick C.R. Virus-induced atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 1978; 148: 335–340.
6. Gyorkey F., Melnick J.L., Guinn G.A. et al. Herpesviridae in the endothelial and smooth muscle cells of the proximal aorta of atherosclerotic patients. *Exp. Mol. Pathol.* 1984; 40: 328–339.
7. Guio L., Sarria C., Cuevas C. et al. Chronic prosthetic valve endocarditis due to *Propionibacterium acnes*: an unexpected cause of prosthetic valve dysfunction. *Rev. Esp. Cardiol.* 2009; 62 (2): 167–177.
8. Hajjar D.P. Viral pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1991; 139: 1195–1211.
9. Izadi M.D., Mozghan F., Saadat S.H. et al. Cytomegalovirus localization in atherosclerotic plaques is associated with acute coronary syndromes: report of 105 patients. *MDCV*. 2012; 8 (2): 42–46.
10. Koren O., Spor A., Felin J. et al. Human oral, gut and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *PNASci USA*. 2011; 108 (1): 4592–4598.
11. Lanter B.B., Sauer K., Davies D.G. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *MBio*. 2014; 10 (5): e01206–e01214.
12. Li L., Messas E., Batista E.L.Jr. et al. *Porphyromonas gingivalis* infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterogenous Apolipoprotein E deficient murine model. *Circulation*. 2002; 105: 861–867.
13. Rafferty B., Jönsson D., Kalachikov S. et al. Impact of monocytic cells on recovery of uncultivable bacteria from atherosclerotic lesion. *J. Intern. Med.* 2011; 270 (3): 273–280.
14. Solberg L.A., Enger S.C., Hjermann I. et al. *Risk factors for coronary and cerebral atherosclerosis in the Oslo study. Atherosclerosis V*. In: A.M. Gotto, L.C. Smith, B. Allen editors. NY: Springer-Verlag. 1980; 57–62.
15. Tremolada S., Delbue S., Ferraresso M. et al. Search for genomic sequences of microbial agents in atherosclerotic plaques. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2011; 24 (1): 243–246.