

© Скочко О. В., Весніна Л. Е., Боброва Н. О., Шликова О. А., Мамонтова Т. В., Ізмайлова О. В., Кайдашев І. П.
УДК 616.132.2-004.6-008.87-092

АНАЛІЗ ОКРЕМИХ ГРУП МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ АТЕРОСКЛЕРОТИЧНО ЗМІНЕНИХ КОРОНАРНИХ АРТЕРІЙ ХВОРИХ, В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД 896 А/Г ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА TLR4*

Скочко¹ О. В., Весніна² Л. Е., Боброва² Н. О., Шликова² О. А., Мамонтова² Т. В., Ізмайлова² О. В., Кайдашев¹ І. П.

¹Кафедра внутрішньої медицини №3, ²НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патології та фармакогенетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава, Україна

Изучены образцы коронарных сосудов, полученные при аутопсии 31 умершего от ишемической болезни сердца (ИБС) и 5 здоровых людей. Пародонтопатогенные микроорганизмы обнаружены в 83,9%. В 51,6% случаев выявлялось 2 и более микроорганизмов. У больных, умерших от ИБС, достоверно чаще встречалась аллель 896 G гена TLR4 ($p=0,04$), ОШ 2,92 (1,15-7,41). Наличие в генотипе индивидуумов полиморфного аллеля G гена TLR4 определяет повышенную контаминацию тканей бляшки представителями следующих видов: Lactobacillus sp., Enterobacterium sp., Sneathia sp. /Leptotrihia sp. /Fusobacterium sp., Mobiluncus sp. /Corynebacterium sp., Peptostreptococcus sp. Полученные результаты подтверждают возможное участие указанных групп микроорганизмов в патогенезе атеросклероза, а также роль полиморфного варианта гена TLR4 в повышенной микробной контаминации тканей коронарных артерий.

Ключевые слова: пародонтопатогенные микроорганизмы, атеросклероз, полиморфизм, Toll-подобный рецептор 4.

Дослідження останніх років переконливо довели, що в основі патогенезу атеросклерозу лежить хронічний запальний процес, що призводить до пошкодження ендотелію та формування в стінці артерій атеросклеротичних бляшок. Тому, все більше уваги приділяється інфекційним агентам, як можливим етіологічним факторам ініціації та прогресування атерогенезу [3, 7].

Актуального значення набуває концепція ініціації процесів атерогенезу при взаємодії екзогенних і ендогенних мікробних лігандів з Toll-подібними рецепторами (TLRs). Генетична мінливість TLR може визначати відмінності в сприйнятливості організмів до бактерій та вірусів, інтенсивності запального процесу [9].

Метою даної роботи стало встановити присутність окремих груп мікроорганізмів, в тому числі парадонтопатогенних, в атеросклеротичній бляшці і навколишніх тканинах та залежність рівня мікробного обсіменіння від поліморфізму 896A/G гена TLR4 (rs4986790), а також виявити можливий зв'язок розвитку атеросклерозу і 896 A/A/G поліморфізму гена TLR4 у хворих на ішемічну хворобу серця (ІХС).

Матеріали та методи дослідження

Досліджено 31 зразок аутопсійного матеріалу тканин коронарних артерій померлих внаслідок ІХС, що отримані у асептичних умовах. Контрольну серію склали зразки від 5 померлих без ІХС. Дослідження проводили з дозволу комісії з біоетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія».

Виділення ДНК з тканини проводили лізуючим методом з використанням набору для виділення ДНК з біоптатів «Хелікопол» (НПФ «Літех», Москва) та отримували розчин ДНК, який використовували для подальшого якісного визначення парадонтопатогенів. Якісне визначення ДНК парадонтопатогенних мікроорганізмів (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus*) проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Специфічну ділянку ДНК ампліфікували на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Москва) з використанням специфічних мультиплексних олігонуклеотидних праймерів, використовуючи набір «МультиДент» (ТОВ НВФ «Гентех», Росія). Ідентифікацію ДНК проводили за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі, забарвленому етідіумом бромідом з наступною візуалізацією в УФ світлі і фотографуванням. Отриманий розчин ДНК використовували для подальшої кількісної оцінки біоти в досліджуваних зразках, яку проводили методом мультиплексної ПЛР в режимі реального часу на детектуючому ампліфікаторі ДТ-322 (НВО «ДНК-Технологія», Москва) за допомогою набору реагентів «Фемофлор» («ДНК-Технологія», Москва), що дозволяє визначати такі показники, як загальна бактеріальна маса і мікроорганізми / групи мікроорганізмів: *Lactobacillus sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Gardnerella vaginalis* / *Prevotella bivia* / *Porphyromonas sp.*, *Eubacterium sp.*, *Sneathia sp.* / *Leptotrihia sp.* / *Fusobacterium sp.*, *Megasphaera sp.* / *Veillonella sp.* / *Dialister sp.*, *Lachnobacterium sp.* / *Clostridium sp.*, *Mobiluncus sp.* /

* Цитування при атестації кадрів: Скочко О. В., Весніна Л. Е., Боброва Н. О., Шликова О. А., Мамонтова Т. В., Ізмайлова О. В., Кайдашев І. П. Аналіз окремих груп мікроорганізмів, виділених із атеросклеротично змінених коронарних артерій хворих, в залежності від Asp299Gly поліморфізму гена TLR4 // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 3-4. – С. 56–58.

Corynebacterium sp., Peptostreptococcus sp., Atopobium (At.) vaginae, Mycoplasma (M.) (genitalium + hominis), Ureaplasma (urealyticum + parvum), Candida sp. Поліморфну ділянку 896A/G гена TLR4 ампліфікували методом ПЛР з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою стандартного пакету програм «STATISTICA 6.0» (StatSoft Inc., США). При порівнянні показників і їх взаємозв'язків використовували непараметричні методи: критерій Вілкоксона, t-тест, внутрішньогрупові кореляції і коваріації. Статистично значущими вважали відмінності при $P < 0,05$. Порівняння частот генотипів між досліджуваними групами проводили шляхом аналізу таблиць поєднання 3x2 за допомогою точного тесту Фішера. Для порівняння частот варіантів у незв'язаних групах обчислювали відношення шансів (ВШ) з визначенням 95% довірчого інтервалу (ДІ).

Результати дослідження та їх обговорення

У відповідності з метою дослідження нами були вивчені зразки аутопсійного матеріалу тканин коронарних артерій 31 пацієнта, що померли від ІХС, і 5 пацієнтів, які померли в результаті інших причин і не мали уражень коронарних артерій. Аналіз 5 зразків тканин коронарних артерій пацієнтів, померлих від причин, не пов'язаних з атеросклерозом, показав відсутність мікроорганізмів в судинній стінці.

При аналізі наявності основних пародонтопатогенних мікроорганізмів у тканинах атеросклеротичних

бляшок коронарних артерій виявлено присутність хоча б одного з мікроорганізмів у 26 з 31 пацієнтів, що склало 83,9%. Найчастіше виявлялися P. gingivalis - 64,5%, T. denticola - 41,9%, A. actinomycetemcomitans - 32,3%, менш часто виявлялись B. forsythus і P. intermedia - 12,9% і 6,5%, відповідно. Слід зазначити, що присутність трьох мікроорганізмів виявлялась в 22,6% зразків. Переважали мікробні асоціації, утворені P. gingivalis, T. denticola, A. actinomycetemcomitans.

На наступному етапі дослідження нами була вивчена частота виявлення поліморфного варіанту 896A/G гена TLR4 серед осіб полтавської популяції (n = 100) і серед пацієнтів, померлих від ІХС (n = 31). Частота розподілу поліморфного варіанту гена TLR4 в обох групах відповідала закону Харді-Вайнберга (χ^2 Пірсона з поправкою Йетса 0,79 і 2,67, відповідно). При порівнянні частоти генотипів (табл. 1) нами виявлена тенденція до збільшення частоти виявлення генотипів AG і GG в групі пацієнтів, померлих від ІХС (p = 0,086). У всіх зразках аутопсії виявлені досліджувані групи мікроорганізмів, за винятком At. vaginae і M. hominis і M. genitalium. Також встановлено, що серед померлих від ІХС достовірно частіше зустрічалася аель G (p = 0,04), ВШ 2,92 (1,15-7,41) при 95% ДІ.

У біопатному матеріалі виявлено 15 зразків з генотипом AA гена TLR4, 3 - з генотипом AG і 2 - з GG. Враховуючи низьку частоту аеля G, генотипи AG і GG були об'єднані в одну групу як носії аеля G.

*Таблиця 1
Розподіл частоти генотипів і аелей поліморфізму 896A/G гена TLR4 серед осіб полтавської популяції померлих від ІХС, % (n)*

Ген, поліморфізм	Частота генотипу	Група популяційного контролю (n=100)	Група померлих від ІХС (n=31)	p*	Частота аеля	Група популяційного контролю	Група померлих від ІХС	χ^2 Пірсона, df=1	ВШ (95% ДІ)	p**
TLR4 896A/G	AA	90 (90)	77,42 (24)	0,086	A	94,5 (189)	85,5 (53)	4,25	2,92 (1,15-7,41)	0,04
	AG	9 (9)	16,13 (5)		G	5,5 (11)	14,5 (9)			
	GG	1 (1)	6,45 (2)							

p* - рівень значущості, отриманий точним тестом Фішера;

p** - рівень значущості, отриманий тестом χ^2

Згідно отриманих результатів (табл. 2), у носіїв аеля G (AG і GG) був достовірно більш високий вміст мікробної ДНК групи Lactobacillus sp. - $4,20 \pm 0,62$ проти $3,01 \pm 0,14$ у носіїв генотипу AA (p < 0,05), Enterobacterium sp. - $4,68 \pm 0,87$ проти $3,09 \pm 0,17$ (p < 0,05), Sneatia sp. / Leptotrichia sp. / Fusobacterium sp. - $3,47 \pm 0,60$ проти $1,78 \pm 0,16$ (p < 0,05), Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. - $3,06 \pm 0,46$ проти $2,18 \pm 0,10$ (p < 0,05), Peptostreptococcus sp. - $3,08 \pm 0,67$ проти $2,00 \pm 0,11$ (p < 0,05). Для уточнення можливих мікробних асоціацій та їх взаємозв'язку з наявністю або відсутністю поліморфного варіанта TLR4 були досліджені внутрішньогрупові кореляції. Серед носіїв генотипу AA були виявлені позитивні достовірні (p < 0,05) кореляційні зв'язки між кількістю ген-еквівалентів наступних пар: Lactobacillus sp. - Enterobacterium sp. (0,984877); Lactobacillus sp. -Staphylococcus sp.

(0,781613); Lactobacillus sp. -Eubacterium sp. (0,554622); Lactobacillus sp. -Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. (0,773681); Enterobacterium sp. - Staphylococcus sp. (0,793504) і Enterobacterium sp. - Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. (0,771553); Staphylococcus sp. -Eubacterium sp. (0,697129) і Staphylococcus sp. -Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. (0,613646). Серед носіїв аеля G (генотипи AG і GG) спостерігалися також достовірні позитивні кореляції, за винятком відсутності пари Lactobacillus sp. - Eubacterium sp. і появою нових: Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. -Lactobacillus sp. (0,826326); Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. - Enterobacterium sp. (0,854616); Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. - Staphylococcus sp. (0,831228) і Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. -Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. (0,909823).

Число ген-еквівалентів груп мікроорганізмів, виділених з атеросклеротично змінених коронарних артерій, пацієнтів з різноманітними генотипами гена Toll-подібного рецептора 4 (TLR4)

Генотипи	Lactobacillus spp.	Enterobacteriaceae	Streptococcus spp.	Staphylococcus spp.	Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.	Eubacterium spp.	Sneathia spp./Leptotrihia spp./Fusobacterium spp.	Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.	Lachnobacterium spp./Clostridium spp.	Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.	Peptostreptococcus spp.	Ureaplasma (urealyticum+ parvum)	Candida spp.
AA (n=15)	3.01± 0.14	3.09± 0.17	2.38± 0.11	2.44± 0.13	2.82± 0.19	2.84± 0.26	1.78± 0.16	2.08± 0.21	3.48± 1.06	2.18± 0.10	2.00± 0.11	1.74± 0.13	3.03± 0.05
AG+GG (n=5)	4.20± 0.62*	4.68± 0.87*	2.96± 0.33	3.18± 0.64	3.50± 0.71	3.24± 0.45	3.47± 0.60*	2.7± 0.45	2.9± 0.36	3.06± 0.46*	3.08± 0.67*	1.76± 0.10	3.14± 0.10

Примітка: * - достовірність відмінностей між генотипами $p < 0,05$.

Отримані нами дані про наявність мікробної ДНК в тканинах атеросклеротичних бляшок підтверджені в дослідженнях інших авторів. Раніше нами були отримані дані, що поліморфізм гену TLR4 Asp299Gly визначає можливість інфікування найбільш розповсюдженими урогенітальними інфекціями [1], доведений зв'язок даного поліморфізму із ревматоїдним артритом [2]. Опубліковані результати, що при аналізі 454 зразків тканин атеросклеротичних бляшок, аортальної і кишкової мікробиоти у всіх пробах бляшок виявлені *Chryseomonas* і у більшості - *Veillonella* і *Streptococcus* (що корелювало з їх наявністю в ротовій порожнині) [6]. Показано, що *P. gingivalis* відіграє важливу роль у гіперплазії інтими аорти в осіб з періодонтитом [5]. Отримані нами результати підвищення контамінації атеросклеротично змінених тканин мікроорганізмами у хворих з поліморфним алелем 896G TLR4 можна пояснити зниженою здатністю такої форми рецептора до проведення сигналу, зокрема викликаного грамнегативними бактеріями [4]. Ці дані підтверджують можливість участі зазначених груп мікроорганізмів в патогенезі атеросклерозу, а також роль поліморфного варіанта гена TLR4 в підвищенні мікробної контамінації тканин коронарних артерій. Наявність в генотипі індивідумів з атеросклеротично зміненими коронарними артеріями алеля G гена TLR4 визначає підвищену контамінацію тканин атеросклеротичної бляшки представниками наступних мікроорганізмів: *Lactobacillus* sp., *Enterobacterium* sp., *Sneathia* sp. / *Leptotrihia* sp. / *Fusobacterium* sp., *Mobiluncus* sp. / *Corynebacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp.

Висновки

Отже, враховуючи результати наших досліджень певне значення в патогенезі атеросклеротичного ураження коронарних артерій та розвитку ІХС належить поліморфізму гена TLR4. Особи, що несуть алель 299Gly мають шанс захворіти ІХС в 2,92 рази частіше, ніж особи з алелем 896G? 896A. Таким чином для більш детального розуміння генетичної структури схильності до розвитку ІХС необхідно продовжувати дослідження у напрямку вивчення поліморфізму гена TLR4, що наблизить нас до розуміння механізмів взаємодії генетичної мінливості TLR та ініціації про-

цесів атерогенезу. В той же час окремі мікроорганізми, в тому числі пародонтопатогени *P. gingivalis*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus* і *P. Intermedia*, також можуть відігравати важливу роль у патогенезі ІХС, що потребує подальшого вивчення цієї проблеми, виявлення вогнищ інфекції, їх санації та пошуку нових ефективних схем з можливим використанням антибіотиків в лікуванні ІХС.

Література

1. Кайдашев І.П. Зв'язок поліморфізмів генів TLR2 та TLR4 зі схильністю до окремих урогенітальних інфекцій / І.П. Кайдашев., О.В. Ізмайлова., О.А. Шликова, Н.О. Боброва // Цитология і генетика – 2011. – Т.4, №29. – С. 35.
2. Белоглазова К. В. Поліморфізм гена Toll-like рецептора 4 Asp299Gly у больних ревматоїдним артритом / К.В. Белоглазова, О.А. Шлыкова, О.В. Измайлова, И.П. Кайдашев // Проблеми екол. та мед. – 2009. – Т.13, № 5-6. – С. 15-17.
3. Alviar C. L. Infectious atherosclerosis: is the hypothesis still alive? A clinically based approach to the dilemma / C.L. Alviar, J.G. Echevezzi, N.I. Jaramillo [et al] // Med. Hypothesis – 2011. Vol. 76, N 4. – P. 517–522.
4. Balistreri C. R., Role of TLR4 polymorphisms in inflammatory responses: implications for unsuccessful aging / C. R. Balistreri, G Candore., F Listi. [et al] // Ann. NY Acad. Sci. – 2007. – Voll. 11. – P. 11–19.
5. Hokamura K., Umemura K. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases – from molecular mechanisms to clinical cases: Porphyromonas gingivalis is the important role of intimal hyperplasia in aorta // J. Pharmacol. Sci. // 2010. – Vol. 113? N 2. – P. 110–114
6. Koren O. Human oral, gut and plaque microbiota in patients with atherosclerosis / O. Koren, A Spor., J Felin. [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. -Vol 108, N 1. – P. 4592–4598.
7. Kurano M., Tsukamoto K. Etiology of atherosclerosis – special reference to bacterial infection and viral infection // Nihon Rinsho – 2011.- Vol. 69, N 1. –P. 25–29.
8. Liadaki K. Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to Streptococcus pyogenes and Haemophilus influenza / K. Liadaki., E. Petinaki, C. Skoulakis [et al] // Clin. Vaccine Immunol. – 2011.-.Vol.18, N 2.-P. 217–222.
9. Montes A.H. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis / A.H. Montes, V. Asensi, V Alvarez [et al] // Clin. Exp. Immunol – 2006.- Vol. 143, N 3. – P. 404-441