

О. В. СКОЧКО, Л. Э. ВЕСНИНА, Н. А. БОБРОВА, О. А. ШЛЫКОВА,
Т. В. МАМОНТОВА, О. В. ИЗМАЙЛОВА, И. П. КАЙДАШЕВ (Полтава)

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИ ИЗМЕНЁННЫХ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ БОЛЬНЫХ, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ASP299GLY ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА TLR4

НИИ генетических и иммунологических основ развития патологии и фармакогенетики,
Украинская медицинская стоматологическая академия <kaidashev@yandex.ru>

Приведены данные определения в 20 образцах атеросклеротически изменённых коронарных артерий инфицированности некоторыми группами микроорганизмов и зависимость уровня микробной обсеменённости от полиморфизма 896A/G гена TLR4. Наличие в генотипе индивидуумов полиморфного аллеля G гена TLR4 определяет повышенную контаминацию тканей атеросклеротической бляшки представителями следующих родов: *Lactobacillus* sp., *Enterobacterium* sp., *Sneathia* sp. / *Leptotrichia* sp. / *Fusobacterium* sp., *Mobiluncus* sp. / *Corynebacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. С помощью внутригруппового корреляционного анализа среди носителей аллеля G выявлены новые корреляционные пары с участием *Lachnobacterium* sp. / *Corynebacterium* sp. Полученные результаты подтверждают возможное участие указанных групп микроорганизмов в патогенезе атеросклероза, а также роль полиморфного варианта G гена TLR4 в повышенной микробной контаминации тканей коронарных артерий.

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

В последние годы всё больше внимания уделяют инфекционным агентам как возможному этиологическому фактору в патогенезе атеросклероза [2, 9]. Имеются обоснованные доказательства роли некоторых микроорганизмов в инициации повреждения и воспаления эндотелия сосудов – *Chlamyidium* (*Chl.*) *pneumoniae* [13], *Porphyromonas* (*P.*) *gingivalis* [15], *Enterobacter hormaechei* [5, 11].

Несомненно, спектр «атерогенных» микроорганизмов будет увеличиваться по мере дальнейших исследований с применением современных технологий.

Известно, что развитие инфекционного процесса зависит не только от свойств микроорганизмов, но и в значительной степени от состояния макроорганизма (активность иммунной системы, неспецифической резистентности и др.). Одной из основных систем, обеспечивающих эффективность врождённого иммунитета, является сеть образраспознающих рецепторов, среди которых наиболее изучены Toll-подобные рецепторы (TLR) [14].

Генетическая изменчивость TLR может определять различия в восприимчивости организмов к бактериям и вирусам, интенсивности воспалительного процесса [10]. Ранее была установлена ассоциация полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 с инфицированностью атеросклеротически изменённых коронарных сосудов парадонтопатогенными микроорганизмами *P. gingivalis*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* [1].

Цель исследования – установление инфицированности атеросклеротически изменённых коронарных артерий некоторыми группами микроорганизмов и зависимости уровня микробной обсеменённости от полиморфизма 896A/G гена TLR4 (rs4986790).

Материалы и методы. Исследовано 20 образцов аутопсического материала, полученного в асептических условиях от умерших вследствие ишемической болезни сердца (ИБС), у которых определение биоты проводили в тканях коронарных артерий, имеющих атеросклеротические бляшки. Исследование проводили с разрешения комиссии по биоэтике Высшего государственного учебного заведения Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия».

ДНК из равных навесок ткани коронарных артерий выделяли в асептических условиях лизирующим методом с использованием набора для выделения ДНК из биоптатов «Хеликопол» (НПФ «Литех», Москва) по рекомендуемой производителем методике. Полученный раствор ДНК использовали для дальнейшей количественной оценки биоты в исследуемых образцах, которую проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе ДТ-322 (НПО «ДНК-Технология», Москва) с помощью набора реагентов «Фемофлор» (ПНО «ДНК-Технология», Москва), позволяющего определять такие показатели, как общая бактериальная масса и микроорганизмы/группы микроорганизмов: *Lactobacillus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* sp., *Eubacterium* sp., *Sneathia* sp. /*Leptotrichia* sp. /*Fusobacterium* sp., *Megasphaera* sp. /*Veillonella* sp. /*Dialister* sp., *Lachnobacterium* sp. /*Clostridium* sp., *Mobiluncus* sp. /*Corynebacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Atopobium* (*At.*) *vaginae*, *Mycoplasma* (*M.*) (*genitalium*+*hominis*), *Ureaplasma* (*urealyticum*+*parvum*), *Candida* sp.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи стандартного пакета программ «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc., США). При сравнении показателей и их взаимосвязей использовали непараметрические методы: критерий Вилкоксона, *t*-тест, внутригрупповые корреляции и ковариации. Статистически значимыми считали различия при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Как показали наши исследования, во всех аутопсиях выявлены определяемые количества исследованных групп микроорганизмов, за исключением *At. vaginae* и *M. hominis* и *M. genitalium*. Данные числа ген-эквивалентов, выраженных в виде логарифма (lg), в образцах ДНК, выделенных из атеросклеротически измененных коронарных артерий, приведены в таблице.

Число ген-эквивалентов групп микроорганизмов, выделенных из атеросклеротически измененных коронарных артерий, пациентов с различными генотипами гена TLR4

Генотип	<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas</i> sp.	<i>Eubacterium</i> sp.	<i>Sneathia</i> sp./ <i>Leptotrichia</i> sp./ <i>Fusobacterium</i> sp.	<i>Megasphaera</i> sp./ <i>Veillonella</i> sp./ <i>Dialister</i> sp.	<i>Lachnobacterium</i> sp./ <i>Clostridium</i> sp.	<i>Mobiluncus</i> sp./ <i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	<i>Ureaplasma</i> (<i>urealyticum</i> + <i>parvum</i>)	<i>Candida</i> sp.
AA (<i>n</i> = 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 (<i>n</i> = 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*	2,70± 0,45	2,90± 0,36	3,06± 0,46*	3,08± 0,67*	1,76± 0,10	3,14± 0,10

* Достоверность отличий между генотипами $P < 0,05$.

В биоптатном материале выявлено 15 с генотипом AA (Asp299Asp) гена TLR4, 3 – с генотипом AG и 2 – с GG. Учитывая низкую частоту аллеля G, генотипы AG и GG были объединены в одну группу как носители аллеля G.

Как видно из полученных результатов, у носителей аллеля G (AG и GG) было достоверно более высокое содержание микробной ДНК группы *Lactobacillus* sp. – $4,20 \pm 0,62$ против $3,01 \pm 0,14$ у носителей аллеля A (AA) ($P < 0,05$), *Enterobacterium* sp. – $4,68 \pm 0,87$ против $3,09 \pm 0,17$ ($P < 0,05$), *Sneathia* sp. /*Leptotrichia* sp. /*Fusobacterium* sp. – $3,47 \pm 0,60$ против $1,78 \pm 0,16$ ($P < 0,05$), *Mobiluncus* sp. /*Corynebacterium* sp. – $3,06 \pm 0,46$ против $2,18 \pm 0,10$ ($P < 0,05$), *Peptostreptococcus* sp. – $3,08 \pm 0,67$ против $2,00 \pm 0,11$ ($P < 0,05$).

Для уточнения возможных микробных ассоциаций и их взаимосвязи с количеством или отсутствием полиморфного варианта TLR4 были исследованы

внутригрупповые корреляции. Среди носителей аллеля А (генотип АА) были выявлены положительные достоверные ($P < 0,05$) корреляционные связи между количеством ген-эквивалентов следующих 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) и *Enterobacterium* sp. – *Mobiluncus* sp. / *Corynebacterium* sp. (0,771553); *Staphylococcus* sp. – *Eubacterium* sp. (0,697129) и *Staphylococcus* sp. – *Mobiluncus* sp. / *Corynebacterium* sp. (0,613646).

Среди носителей аллеля G (генотипы AG и GG) наблюдались также достоверные положительные корреляции, за исключением отсутствия пары *Lactobacillus* sp. – *Eubacterium* sp. и появлением новых: *Lachnobacterium* sp. / *Clostridium* sp. – *Lactobacillus* sp. (0,826326); *Lachnobacterium* sp. / *Clostridium* sp. – *Enterobacterium* sp. (0,854616); *Lachnobacterium* sp. / *Clostridium* sp. – *Staphylococcus* sp. (0,831228) и *Lachnobacterium* sp. / *Clostridium* sp. – *Mobiluncus* sp. / *Corynebacterium* sp. (0,909823).

Полученные нами данные о наличии микробной ДНК в тканях атеросклеротических бляшек подтверждены в исследованиях других авторов. Опубликованы результаты, что *Lactobacillus rhamnosus* могут вызывать септические осложнения у больных, которым назначали пробиотики перед протезированием аортального клапана [7], *Lactobacillus casei* могут участвовать в патогенезе расслаивающейся аневризмы аорты [12]. При анализе 454 образцов тканей атеросклеротических бляшек, образцов аортальной и кишечной микробиоты во всех пробах бляшек выявлены *Chryseomonas* и у большинства – *Veillonella* и *Streptococcus* (что коррелировало с их наличием в ротовой полости) [8]. Показано, что *P. gingivalis* играет важную роль в гиперплазии интимы аорты у лиц с периодонтитом [6]. Недостаточно данных о роли *Leptotrichia* в поражении сосудов, несмотря на имеющиеся сведения о развитии бактериемии, вызванной этими микроорганизмами, обычно колонизирующими в ротовой полости и урогенитальных путях [4]. Полученные нами результаты повышения контаминации атеросклеротически изменённых тканей микроорганизмами у больных с полиморфным аллелем TLR4 299 Gly можно объяснить сниженной способностью такой формы рецептора к проведению сигнала, в частности вызванного грамотрицательными бактериями [3].

Полученные данные подтверждают возможное участие указанных групп микроорганизмов в патогенезе атеросклероза, а также роль полиморфного варианта G гена TLR4 в повышенной микробной контаминации тканей коронарных артерий.

Выводы. Таким образом, по нашим данным, наличие в генотипе индивидуумов с атеросклеротическими изменёнными коронарными артериями полиморфного аллеля G гена TLR4 определяет повышенную контаминацию тканей атеросклеротической бляшки представителями следующих родов: *Lactobacillus* sp., *Enterobacterium* sp., *Sneathia* sp. / *Leptotrichia* sp. / *Fusobacterium* sp., *Mobiluncus* sp. / *Corynebacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. Кроме того, при анализе внутригрупповых корреляций среди этих носителей аллеля G выявлены новые корреляционные пары с участием *Lachnobacterium* sp. / *Clostridium* sp.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Украины, НИР № 0109U001629 «Определение роли полиморфизма Toll-подобных рецепторов в механизмах развития иммунопосредованных заболеваний».

Список литературы

1. Скочко О. В., Боброва Н. А., Измайлова О. В., Кайдашев И. П. Роль некоторых парадонтопатогенных микроорганизмов и полиморфизма Asp299Gly гена TLR4 в патогенезе атеросклероза // Журн. микробиологии и эпидемиологии. – 2011. – № 5. – С. 83–85.
2. Alviar C. L., Echevezzi J. G., Jaramillo N. I. et al. Infectious atherosclerosis: is the hypothesis still alive? A clinically based approach to the dilemma // Med. Hypothesis. – 2011. – Vol. 76, N 4. – P. 517–522.
3. Balistreri C. R., Candore G., Listi F. et al. Role of TLR4 polymorphisms in inflammatory responses: implications for unsuccessful aging // Ann. NY Acad. Sci. – 2007. – Vol. 11. – P. 11–19.

4. Cooreman S., Schuermans C., Van Schaeren J. et al. Bacteraemia caused by *Leptotrichia trevisanii* in a neutropenic patients // *Anaerobe*. – 2011. – Vol. 17, N 1. – P. 1–3.
5. Hayashi C., Gudino C. V., Gibson F. C. 3rd, Genco C.A. Review: Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways // *Mol. Oral. Microbiol.* – 2010. – Vol. 25, N 5. – P. 305–316.
6. 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.
7. Kochan P., Chielazczyk A., Szymaniak L. et al. *Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardiosurgical patients – is the time right to revise probiotic safety guidelines? // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2011. – Vol. 17, N 10. – P. 1589–1592.
8. Koren O., Spor A., Felin J. et al. Human oral, gut and plaque microbiota in patients with atherosclerosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, N 1. – P. 4592–4598.
9. 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.
10. Liadaki K., Petinaki E., Skoulakis C. et al. Toll-like receptor 4 gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tonsillar disease due to *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2011. – Vol. 18, N 2. – P. 217–222.
11. Rafferty B., Dolgilevich S., Kalachikov S. et al. Cultivation of *Enterobacter hormaechei* from human atherosclerotic tissue // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2011. – Vol. 18, N 1. – P. 72–81.
12. Russo A., Angeletti S., Lorino G. et al. A case of *Lactobacillus casei* bacteraemia associated with aortic dissection: is there a link? // *New Microbiol.* – 2010. – Vol. 33, N 2. – P. 175–178.
13. Schiavoni G., Di Pietro M., Ronco C. et al. *Chlamydia pneumoniae* infection as a risk factor for accelerated atherosclerosis in haemodialysis patients // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2010. – Vol. 24, N 3. – P. 367–375.
14. Vallejo J. R. Role of toll-like receptors in cardiovascular disease // *Clin. Sci. (Lond.)*. – 2011. – Vol. 121, N 1. – P. 1–10.
15. Zoellner H. Dental infection and vascular disease // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2011. – Vol. 37, N 3. – P. 181–192.

КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ ДЕЯКИХ ГРУП МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ З АТЕРОСКЛЕРОТИЧНО ЗМІНЕНИХ КОРОНАРНИХ АРТЕРІЙ ХВОРИХ, ЗАЛЕЖНО ВІД ASP299GLY ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА TLR4

О. В. Скочко, Л. Е. Весніна, Н. О. Боброва, О. А. Шликова,
Т. В. Мамонтова, О. В. Ізмайлова, І. П. Кайдашев (Полтава)

Наведені дані визначення у 20 зразках атеросклеротично змінених коронарних артерій інфікування деякими групами мікроорганізмів і залежності рівня мікробного обсіменіння від поліморфізму 896A/G гена TLR4. Наявність у генотипі індивідуумів поліморфного алелю G гена TLR4 визначає підвищену контамінацію тканин атеросклеротичної бляшки представниками таких родів: *Lactobacillus* sp., *Enterobacterium* sp., *Sneathia* sp. /*Leptotrichia* sp. /*Fusobacterium* sp., *Mobiluncus* sp. /*Corynebacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. За внутрішньогруповим кореляційним аналізом виявлено серед носіїв алеля G нові кореляційні пари за участю *Lachnobacterium* sp. /*Corynebacterium* sp. Отримані результати підтверджують можливу участь наведених груп мікроорганізмів у патогенезі атеросклерозу, а також роль поліморфного варіанта G гена TLR4 у підвищеній мікробній контамінації тканин коронарних артерій.

Ключові слова: парадонтопатогенні мікроорганізми, поліморфізм, Toll-подібний рецептор 4, атеросклероз.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF INDIVIDUAL GROUPS OF MICROORGANISMS, EXTRACTED FROM ATHEROSCLEROTIC LESIONS IN THE CORONARY ARTERIES IN PATIENTS DEPENDING UPON ASP299GLY POLYMORPHISM OF TLR4 GENE

O. V. Skochko, L. E. Vesnina, N. A. Bobrova, O. A. Shlykova,
T. V. Mamontova, O. V. Izmailova, I. P. Kaidashev (Poltava)

The estimation data of contamination by separate groups of microorganisms and dependence of the microbial content level upon TLR4 gene 896A/G polymorphism in 20 samples of atherosclerotic lesions in coronary arteries has been presented. The presence of TLR4 gene polymorphic allele G in the individual genotype determines the increased contamination of atherosclerotic plaque tis-

sues by the representatives of the following genera: *Lactobacillus* sp., *Enterobacterium* sp., *Sneathia* sp. /*Leptotrihia* sp. /*Fusobacterium* sp., *Mobiluncus* sp. /*Corynebacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. The emergence of new correlation pairs with participation of *Lachnobacterium* sp. /*Corynebacterium* sp. among the carriers of G allele has been revealed via the intragroup correlation analysis. The obtained results confirm the possible involvement of the represented groups of microorganisms in the pathogenesis of atherosclerosis and the role of the TLR4 gene polymorphic variant G in the increased microbial contamination of the coronary arteries tissues.

Key words: periodontopathogenic microorganisms, polymorphism, Toll-like receptor 4, atherosclerosis.

УДК 616.3:612.15.32-053.7

Надійшла 09.12.2011

Г. П. МОСІЄНКО (Київ)

РОЛЬ ГІПОФІЗАРНО-ГОНАДНОЇ СИСТЕМИ В ГЕНЕЗІ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ТРАВНОГО КАНАЛУ У ПІДЛІТКІВ

ДУ «Інститут педіатрії, акушерства та гінекології» <arm-21@mail.ru>

При різних клінічних формах функціональних уражень органів травної системи у підлітків виявлена однотипова векторність зрушень гормонального статусу при дослідженні гіпофізарно-гонадної системи, що свідчить про домінуючу роль нейроендокринних механізмів у патогенезі цих захворювань.

Ключові слова: підлітки, фолікулостимулюючий гормон, лютеотропін, тестостерон, прогестерон, функціональні розлади системи травлення.

Вступ. Гіпофізарно-гонадна система має особливе значення у формуванні сомато-статевого розвитку підлітків, тобто у віці, коли формуються функціональні розлади органів і систем, у тому числі травної [1, 2, 5].

Часто у підлітків формується синдром пубертатного періоду, для якого характерні гормонально-обмінні порушення, обумовлені в основному підвищенням секреції АКТГ, гормонів кори наднирників, а також порушенням секреції гонадотропінів [4, 6]. Нерідко при цьому виникає гіпоталамічний синдром підліткового віку. У дівчат може мати місце передчасне статеве дозрівання. Відмічається лабільність артеріального тиску, порушення терморегуляції, депресивні стани тощо.

Гетерохромний розвиток різних відділів нервової системи призводить до розбалансування функцій як у центральній, так і у вегетативній нервовій системі [3]. Особливого значення набуває функція гіпоталамуса та гіпофіза. Розвиток організму в пубертатному періоді відбувається переважно під впливом тропних гормонів. Значення гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи в пубертатному періоді настільки велике, що С. У. Brook назвав його періодом гіпофізарної домінанти [5].

Мета дослідження – вивчити особливості змін в гіпофізарно-гонадній системі у підлітків з функціональними розладами системи травлення та визначити їх роль в генезі цих порушень.

Матеріали і методи. Стан гіпофізарно-гонадної системи при функціональних захворюваннях органів травної системи вивчали у 164 хворих. Юнаків було 76 (46,3 %), дівчат – 88 (53,7 %). Серед юнаків у віці 15 років було 48 (63,2 %), 16 років – 19 (25 %) і 17–18 років – 9 (11,8 %); дівчат – відповідно 52 (59,1 %), 26 (29,5 %) і 10 (11,4 %).

Гастроезофагеальний рефлюкс (ГР) діагностовано у 54 (32,9 %) хворих, функціональну диспепсію (ФД) – у 58 (35,4 %) і дисфункцію жовчного міхура (ДЖМ) – у 52 (31,7 %).

Сомато-статевий розвиток оцінювали під час поглибленого медичного огляду. За необхідності проводили ультразвукове (УЗ) дослідження. В одній пробі крові визначали концентрацію фолікулостимулюючого (ФСГ), лютеїнізуючого (ЛГ)