© 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 A/G ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА TLR4*

Скочко[1] О. В., Весніна[2] Л. Е., Боброва[2] Н. О., Шликова[2] О. А., Мамонтова[2] Т. В., Ізмайлова[2] О. В., Кайдашев[1] І. П.

[1]Кафедра внутрішньої медицини №3, [2]НДІ 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 пародонтопатогенів. Якісне визначення ДНК пародонтопатогенних 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. / 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

* *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.*

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 3х2 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 ($\chi 2$ 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 алель G (p = 0,04), ВШ 2,92 (1,15-7,41) при 95% ДІ.

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

Таблиця 1
Розподіл частоти генотипів і алелей 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 алеля	Група популяційного контролю	Група померлих від ІХС	χ^2 Пірсона, df=1	ВШ (95% ДІ)	p^{**}
TLR4 896A/G	AA AG GG	90 (90) 9 (9) 1 (1)	77,42 (24) 16,13 (5) 6,45 (2)	0,086	A G	94,5 (189) 5,5 (11)	85,5 (53) 14,5 (9)	4,25	2,92 (1,15-7,41)	0,04

p^* - рівень значущості, отриманий точним тестом Фішера;
p^{**} - рівень значущості, отриманий тестом χ^2

Згідно отриманих результатів (табл. 2), у носіїв алеля G (AG і GG) був достовірно більш високий вміст мікробної ДНК групи Lactobacillus sp. - 4,20 ± 0,62 проти 3,01 ± 0,14 у носіїв генотипу AA (p < 0,05), Enterobacterium sp. - 4,68 ± 0,87 проти 3,09 ± 0,17 (p < 0,05), Sneatia sp. / Leptotrichia sp. / Fusobacterium sp. - 3,47 ± 0,60 проти 1,78 ± 0,16 (p < 0,05), Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. - 3,06 ± 0,46 проти 2,18 ± 0,10 (p < 0,05), Peptostreptococcus sp. - 3,08 ± 0,67 проти 2,00 ± 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 алеля 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).

Таблиця 2

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 мікробіоти 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 можливу участь зазначених груп мікроорганізмів в патогенезі атеросклерозу, а також роль поліморфного варіанта гена TLR4 в підвищенні мікробної контамінації тканин коронарних артерій. Наявність в генотипі індивідуумів 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., Mobilincus 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 процесів 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 и генетика – 2011. –Т.4, №29. – С. 35.
2. Белоглазова К. В. Полиморфизм гена Toll-like рецептора 4 Asp299Gly у больных ревматоидным 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 unsuccesful 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

English version: ANALYSIS OF SPECIFIC GROUPS OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM ATHEROSCLEROTIC CORONARY ARTERIES OF PATIENTS DEPENDING ON ASP299GLY POLYMORPHISM OF TLR4 GENE*

Skochko[1] O. V., Vesnina[2] L. E., Bobrova[2] N. O., Shlykova[2] O. A., Мамontova[2] T. V., Izmaylova[2] O. V., Kaydashev[1] I. P.

[1]Department of Internal Medicine №3, [2]SRI of genetic and immunological foundations of pathology development and pharmacogenetics of Higher State Educational Esteblishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava, Ukraine

The aim of this work was to establish the presence of specific groups of microorganisms, including paradontopathogenic in atherosclerotic plaque and surrounding tissues and the dependence of microbial contamination of polymorphism 896A / G gene TLR4 (rs4986790), and to identify the possible relationship of atherosclerosis and Asp299Gly gene polymorphism TLR4 in patients with coronary heart disease (CHD). Materials and methods: The 31 autopsies of coronary arteries from patients whodied from coronary arteries disease and 5 from healthy individuals. Results and discussions: The presence of periodontal pathogenic microorganisms in atherosclerotic plaques was observed in 83,9%. In 51,6% two or more species of microorganisms were found. Only in 11,1% samples with atherosclerotic plaques the microorganisms were found in undamaged tissues. The patients who died from coronary arteries disease had 299Gly allele of TLR4 gene more frequent than healthy individuals (p=0,04) OR 2,92 (1,15-7,41). The presence of TLR4 gene polymorphic allele G in the individual genotype determines the increased contamination of atherosclerotic plaque tissues 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. Conclusion: 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. The presence of 299Gly allele of TLR4 gene increases the risk of this disease.

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

Recent studies have convincingly demonstrated that pathogenesis of atherosclerosis is based on a chronic inflammation that causes endothelial damage and formation of atherosclerotic plaques in the artery wall. Therefore, increased attention is paid to infectious agents as possible etiological factors of initiation and progression of atherogenesis [3 , 7].

The concept of atherogenesis initiation through an interaction of endogenous and exogenous microbial ligands with Toll-like receptors (TLRs) gains an ever increasing importance. A genetic variability of TLR can determine differences in the susceptibility of organisms to bacteria and viruses as well as in the intensity of the inflammatory process [9].

The aim of the present study was to establish the presence of specific groups of microorganisms, including periodontal pathogens in the atherosclerotic plaque and surrounding tissues, investigate a dependence of microbial contamination on 896A / G gene TLR4 (rs4986790) polymorphism as well as to identify possible relationship of atherosclerosis and Asp299Gly polymorphism of the TLR4 gene in patients with ischemic heart disease (IHD).

Materials and methods

31 aseptically obtained autopsy tissue samples of coronary arteries from people who died of IHD were investigated. The controls were people who died of causes unrelated to IHD. The study was conducted with the permission of the Commission on Bioethics of State Higher Educational Institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy".

DNA isolation from tissue lysates was performed with a DNA extraction kit for the biopsies "Helikopol" ("Litech", Moscow). The obtained DNA solutions were used for further qualitative detection of periodontal pathogens. A qualitative DNA determination of periodontal pathogenic microorganisms (Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Treponema denticola, Bacteroides forsythus) was performed with polymerase chain reaction (PCR). Specific plots of DNA were amplified with DNA amplifier "Tertsyk" ("DNA Technology", Moscow) using specific multiplex oligonucleotide primers from "MultyDent" kit ("Gentech", Russia). DNA identification was performed by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide, followed by visualization under UV light and photography. The obtained DNA solution was used to further quantify the biota in the samples, performed with a multiplex PCR on a real-time detecting amplifier DT-322 ("DNA Technology", Moscow) using "Femoflor" kit ("DNA Technology"), which allows to determine such factors as the total bacterial mass and microorganisms/groups of microorganisms: 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. / Corynebacterium sp., Peptostreptococcus sp., Atopobium (At.) vaginae, Mycoplasma (M.) (genitalium + hominis), Ureaplasma (urealyticum + parvum), Candida sp. The polymorphic

* *To cite this English version: Skochko O. V., Vesnina L. E., Bobrova N. O., Shlykova O. A., Мамontova T. V., Izmaylova O. V., Kaydashev I. P. Analysis of specific groups of microorganisms isolated from atherosclerotic coronary arteries of patients depending on Asp299Gly polymorphism of TLR4 gene / / Problemy ekologii ta medytsyny. - 2013. - Vol 17, № 3-4. - P. 59 -61.*

site of the Asp299Gly TLR4 gene was amplified by PCR using specific oligonucleotide primers.

Statistical analysis of the data was performed with a standard software package «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc., USA). For data comparisons nonparametric methods were used: Wilcoxon test, t-test, intragroup correlations and covariances. Differences were considered statistically significant at P<0,05. Comparison of genotype frequencies between the groups was performed by analysis of 3x2 combination tables with Fisher's exact test. To compare frequencies of variants in unrelated groups we calculated the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI).

Results and discussion

According to the research goal we studied tissue samples of autopsy material of coronary arteries of 31 patients who died of IHD, and of 5 patients who died of other causes and did not have lesions of coronary arteries. An analysis of the 5 tissue samples of coronary arteries of the patients who died of causes unrelated to atherosclerosis showed no microorganisms in the vascular wall.

An analysis for presence of major parodontopathogenic microorganisms in the atherosclerosis plague tissues of the coronary arteries revealed presence of at least one of the microorganisms in 26 of 31 patients, which comprised 83,9%. The most frequently found microorganisms were P. gingivalis - 64,5%, T. denticola - 41,9%, A. actinomycetemcomitans - 32,3%, while B. forsythus i P. intermedia were found less frequently - 12,9% i 6,5% respectively. Notably, presence of three microorganisms was found in 22,6% samples. The prevalent microbial associations were comprised of P. gingivalis, T. denticola, A. actinomycetemcomitans.

In the next stage of our research we studied frequency of the Asp299Gly gene TLR4 among individuals of Poltava population (n = 100) and among the patients who died of IHD (n = 31). The distribution frequency of polymorphic variants of the TLR4 gene corresponded to the Hardy-Weinberg principle (Pearson χ2 with Yates correction was 0,79 i 2,67 respectively). A comparison of genotype frequencies (Table 1) demonstrated a tendency to increased frequencies of the genotypes AG and GG in the group of patients who died of IHD (p = 0,086). We found the investigated groups of the microorganisms except At. vaginae, M. hominis and M. genitalium in all autopsy samples. We also observed that the allele G was significantly more frequently found (p = 0,04) in the subjects who died of IHD, the odds ratio was 2,92 (1,15-7,41) with 95% confidence interval.

Table 1

The distribution of genotypes and allele frequencies of gene polymorphisms TLR4 Asp299Gly among Poltava population died of coronary heart disease (CHD), % (n)

The gene, polymorphism	The frequency of genotype	Group population control (n=100)	Group deaths from coronary heart disease (n=31)	p^*	The frequency of genotype	Group population control	Group deaths from coronary heart disease	χ^2 Pearson, df=1	RR (95% CI)	p^{**}
TLR4 Asp299Gly	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^* - the level of significance obtained Fisher's exact test

p^{**} - the level of significance of the resulting test χ^2

We found 15 with the genotype AA (Asp299Asp) gene TLR4, 3 - with the genotype AG and 2 - with the genotype GG in the biopsy material. Because of low frequency of the allel G, both AG and GG genotypes were combined into one group as carriers of the allele G.

According to the obtained results (Table 2) the carriers of the allele G had a significantly higher content of microbial DNA of the groups of Lactobacillus sp. - 4,20 ± 0,62 vs 3,01 ± 0,14 in the carriers of the allele A (AA) (p < 0,05), Enterobacterium sp. - 4,68 ± 0,87 vs 3,09 ± 0,17 (p < 0,05), Sneatia sp. / Leptotrichia sp. / Fusobacterium sp. - 3,47 ± 0,60 vs 1,78 ± 0,16 (p < 0,05), Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. - 3,06 ± 0,46 vs 2,18 ± 0,10 (p < 0,05), Peptostreptococcus sp. - 3,08 ± 0,67 vs 2,00 ± 0,11 (p < 0,05). To clarify the possible microbial associations and their relationship to the presence or absence of polymorphic variants of TLR4 intragroup correlations were investigated. Among the carriers of the allele A (AA genotype) positive significant (p < 0.05) correlations were found between the number of gene-equivalents of the pairs: 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) i Enterobacterium sp. - Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. (0,771553); Staphylococcus sp. -Eubacterium sp. (0,697129) and Staphylococcus sp. -Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. (0,613646). Among the carriers of the allele G (genotypes AG and GG) statistically significant positive correlations were also observed, except for an absence of the pair Lactobacillus sp. - Eubacterium sp. and an emergence of a new pair: Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. -Lactobacillus sp. (0,826326); Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. - Enterobacterium sp. (0,854616); Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. -Staphylococcus sp. (0,831228) i Lachnobacterium sp. / Clostridium sp. - Mobiluncus sp. / Corynebacterium sp. (0,909823).

Table 2

The number of gene-equivalent groups of microorganisms isolated from atherosclerotic altered coronary arteries of patients with different genotypes of the gene Toll-like receptor 4 (TLR4)

Genotype	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

*Note: * - the significance of differences between genotypes p<0,05.*

Our data on the presence of microbial DNA in tissues of atherosclerotic plaques is confirmed in studies by other authors. Previously, we have obtained evidence that TLR4 Asp299Gly gene polymorphism determines the possibility of infection with the most common urogenital infections [1], rheumatoid arthritis [2]. It was reported that an analysis of 454 tissue samples of atherosclerotic plaques as well as samples of aortic and intestinal microbiota revealed presence of Chryseomonas in all samples and that of Veillonella and Streptococcus in most plaque samples (which correlated with their presence in the mouth) [6]. It was shown that P. gingivalis plays an important role in aortic intimal hyperplasia in patients with periodontitis [5]. Our data of increased contamination of atherosclerotic tissue by microorganisms in patients with polymorphic allele TLR4 Gly 299 can be explained by a reduced signal transmission ability of this receptor form, caused in particular by Gram-negative bacteria [4]. These findings support a possible involvement of these groups of microorganisms in the pathogenesis of atherosclerosis and the role of a polymorphic variant of the allele G of the TLR4 gene in an increase of microbial contamination of coronary artery tissues. The presence of a polymorphic variant of the allele G of the TLR4 gene in the genotype of individuals with atherosclerotic coronary arteries determines an increased contamination of the atherosclerotic plaque tissue by the following microorganisms: Lactobacillus sp., Enterobacterium sp., Sneathia sp. / Leptotrihia sp. / Fusobacterium sp., Mobilincus sp. / Corynebacterium sp., Peptostreptococcus sp.

Conclusions

Thus, from our findings we can conclude that a polymorphism of the TLR4 gene is of importance in the pathogenesis of coronary atherosclerosis and development of IHD. The risk of developing IHD is 2,92 bigger in the individuals who carry the allele 299Gly compared to those with the allele 299Asp. Therefore, it is necessary to continue research of the TLR4 gene polymorphism for a more detailed understanding of the genetic structure of susceptibility to IHD, which will bring us closer to understanding the mechanisms of interaction between a genetic variation of TLR and initiation of atherogenesis. At the same time, some microorganisms, including periodontal pathogens P. gingivalis, T. denticola, A. actinomycetemcomitans, B. forsythus and P. intermedia may also play an important role in the pathogenesis of IHD. It evokes a need to further study the subject further as well as identify the infection sources, their elimination and finding new effective schemes of possible use of antibiotics in the treatment of IHD.

References

1. Kaydashev I.P. Zv'yazok polimorfizmiv geniv TLR2 ta TLR4 zi schi-l'nistyu do okremich urogenital'nich infekziy / I.P. Kaydashev O.V. Izmaylova, O.A. Shlikova, N.O Bobrova // Zitolo-giya i genetika – 2011 – Vol.4. – P. 29 – 35.
2. Beloglazova K.V. Polimorfizm gena Toll-like rezeptora 4 Asp299Gly u bol'nych revmatoidnym artritom / K.V. Beloglazova, O.A Shlykova., O.V Izmaylova., I.P Kaydashev// Problemi ekol. ta med. – 2009. – Vol.13(5-6). – P. 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 unsuccesful aging / C. R Balistreri., G. Candore, F Listi. [et al] // Ann. NY Acad. Sci. – 2007. – Vol. 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 influenzae / 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, N3. – P. 404-413.