

DOI 10.52727/2078-256X-2022-18-1-56-67

Микробиом крови пациентов с атеросклерозом**Д.М. Шарифуллина¹, О.К. Поздеев², Р.Н. Хайруллин¹**

¹ Государственное автономное учреждение здравоохранения
«Межрегиональный клинико-диагностический центр»
420101, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карбышева, 12А

² Казанская государственная медицинская академия –
филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
дополнительного профессионального образования
«Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
420012, Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Муштаря, 11

Цель исследования – оценить состав микробиома крови пациентов с атеросклерозом, сравнить его с микрофлорой и микробиомом атеросклеротических бляшек, а также выявить общие таксоны для микробиомов крови и атеросклеротических бляшек и провести корреляционный анализ различных параметров крови и мочи у обследованных пациентов со структурой «ядра» бактериального сообщества крови. **Материал и методы.** Обследовано 19 мужчин и 5 женщин в возрасте 33–81 года (средний возраст $64,1 \pm 9,8$ года) с атеросклерозом общих сонных артерий, подтвержденным данными ультразвуковой доплерографии сосудов. С помощью секвенирования генов *16S* рибосомной РНК (*16S pPHK*) исследовано микробное разнообразие 24 образцов крови, бактериологическим методом – 16 образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий. **Результаты.** Большинство полученных последовательностей было классифицировано как *Proteobacteria* (73,9 %), *Actinobacteria* (11,4 %), *Bacteroidetes* (2,8 %), *Cyanobacteria* (1,3 %), *Firmicutes* (1,1 %), *Fusobacteria* (0,7 %). Во всех исследованных образцах крови пациентов с атеросклерозом обнаружены гены *16S pPHK Propionibacterium acnes*, недифференцированные виды семейств *Micromonosporaceae*, *Caulobacteraceae*, *Bradyrhizobiaceae*, родов *Bradyrhizobium* и *Sphingomonas*, составивших от 67,7 до 87,5 % таксонов микробного сообщества. 75 % образцов биоптатов атеросклеротических бляшек показали рост бактерий: *Propionibacterium acnes* (43,8 %), *Staphylococcus epidermidis* (18,8 %), *Staphylococcus capitis* (6,3 %), *Staphylococcus saccharolyticus* (6,3 %). Общими таксонами для микробиомов крови и атеросклеротических бляшек являются *Propionibacterium acnes* и *Bradyrhizobiaceae*. **Обсуждение.** Настоящее исследование впервые сообщает о микробиоме крови пациентов с атеросклерозом, а также обнаружило жизнеспособные культуры *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus* в образцах биоптатов атеросклеротических бляшек, обеспечив механистическую связь микроорганизмов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Общими таксонами для микробиомов крови и атеросклеротических бляшек являются *Propionibacterium acnes* и *Bradyrhizobiaceae*. Можно предположить, что вид *Propionibacterium acnes* является специфичным таксоном и атеросклеротических бляшек сонных артерий, и крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий; требуется проведение дополнительных исследований этиологической значимости микробного фактора в формировании атеросклеротических бляшек.

Ключевые слова: атеросклероз, бактерия, микробиом, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus*.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Шарифуллина Д.М., e-mail: dilmag57@mail.ru

Для цитирования: Шарифуллина Д.М., Поздеев О.К., Хайруллин Р.Н. Микробиом крови пациентов с атеросклерозом. *Атеросклероз*, 2022; 18 (1): 56–67. doi: 10.52727/2078-256X-2022-18-1-56-67

Blood microbiome of patients with atherosclerosis

D.M. Sharifullina¹, O.K. Pozdeev², R.N. Khayrullin¹

¹ Interregional Clinic and Diagnostic Center

420101, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, Karbyshev str., 12A

² Kazan State Medical Academy – Branch Campus of the Federal State Budgetary Educational Institution of Further Professional Education

«Russian Medical Academy of Continuous Professional Education»

420012, Russia, Republic of Tatarstan, Kazan, Mushtari str., 11

Aim of the study was to assess the composition of blood microbiome in patients with atherosclerosis, to compare it with microflora and microbiome of atherosclerotic plaques, to identify common taxons for microbiomes of blood and atherosclerotic plaques, as well as to perform a correlation analysis of various blood and urine parameters in the examined patients with the structure of «core» of the blood bacterial community. **Material and methods.** 19 men and 5 women aged 33–81 years (mean age 64.1 ± 9.8 years) with common carotid artery atherosclerosis confirmed by Doppler ultrasonography of vessels were examined. The microbial diversity of 24 blood samples from patients with vascular atherosclerosis was examined using 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene sequencing. 16 samples of atherosclerotic carotid artery plaques were examined by a bacteriological method. Correlation analysis of the results was performed by methods of nonparametric statistics. **Results.** Most of the sequences obtained were classified as *Proteobacteria* (73.9 %), *Actinobacteria* (11.4 %), *Bacteroidetes* (2.8 %), *Cyanobacteria* (1.3 %), *Firmicutes* (1.1 %), *Fusobacteria* (0.7 %). Genes of 16S rRNA of *Propionibacterium acnes*, undifferentiated species of the families Micrococcaceae, Caulobacteraceae, Bradyrhizobiaceae, genera *Bradyrhizobium* and *Sphingomonas* were found in all the examined blood samples of patients with atherosclerosis and comprised from 67.7 to 87.5 % of the microbial community taxons. 75 % of biopsy samples from atherosclerotic plaques showed growth of the bacteria: *Propionibacterium acnes* (43.8 %), *Staphylococcus epidermidis* (18.8 %), *Staphylococcus capitis* (6.3 %), *Staphylococcus saccharolyticus* (6.3 %). The common taxons for blood microbiomes and atherosclerotic plaques are *Propionibacterium acnes* and Bradyrhizobiaceae. **Discussion.** The present study is the first to report the blood microbiome of patients with atherosclerosis and to detect viable cultures of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus* in biopsy samples of atherosclerotic plaques, providing a mechanistic link between microorganisms and cardiovascular disease. *Propionibacterium acnes* and Bradyrhizobiaceae are common taxons for blood microbiomes and atherosclerotic plaques. It can be assumed that *Propionibacterium acnes* species is a specific taxon both of atherosclerotic carotid artery plaques and blood of patients with carotid atherosclerosis; additional studies on the etiological significance of the microbial factor in the formation of atherosclerotic plaques are required.

Keywords: atherosclerosis, bacteria, microbiome, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus*.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence: Sharifullina D.M., e-mail: dilmag57@mail.ru

Citation: Sharifullina D.M., Pozdeev O.K., Khayrullin R.N. Blood microbiome of patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2022; 18 (1): 56–67. [In Russian]. doi: 10.52727/2078-256X-2022-18-1-56-67

Введение

Клинические проявления атеросклероза представляют собой наиболее частую причину смерти и являются одним из важнейших источников заболеваемости, инвалидности и госпитализации [1]. Для России эта проблема также весьма значима, так как абсолютные цифры смертности от осложнений атеросклероза (инфаркт миокарда или инсульт ЦНС) в России значительно выше (85–90 %), чем в странах Западной Европы, США и Японии. В частности, ежегодно в РФ почти у 300 тыс. человек возникает инфаркт миокарда, причем у 20 % из них

он заканчивается внезапной смертью. При этом если в 2013 г. диагноз «ишемическая болезнь сердца» был первично зарегистрирован более чем у 1,7 млн человек, то к настоящему времени число подобных больных превышает 7,8 млн человек [2, 3]. В течение последних десятилетий предметом дискуссии остается роль микробного фактора в развитии атеросклероза, основанием для чего явились многочисленные находки в атеросклеротических бляшках различных микроорганизмов [4–6]. Хотя хорошо документировано, что воспаление является важным фактором риска для патофизиологии сосудов, связь бактерий с атеросклерозом четко не установлена в

значительной степени из-за неспособности изолировать живые бактерии из атероматозной ткани. Согласно мнению Е. Козагов, в отличие от растущих доказательств того, что атеросклероз является хроническим заболеванием, вызванным и усугубляемым инфекционными агентами, существует ограниченность экспериментальных данных относительно фактической ассоциации патогенов с воспалением сосудов. Доказательства наличия бактерий на пораженном участке (постулат Коха) необходимы для определения причинно-следственной связи и разработки соответствующей диагностики и лечения [7].

Можно полагать, что основным транспортером микроорганизмов в очаги изменений в сосудистой стенке и последующим колонизатором атеросклеротических бляшек является кровь. С этой целью нами предпринято изучение микробиома крови пациентов с атеросклеротическим поражением артерий. Ранее мы выполнили исследование по определению микробиома атеросклеротических бляшек [8], и настоящая работа позволила провести сравнение двух микробиомов (крови и атеросклеротических бляшек) и обнаружить общие таксоны, специфичные для обоих локусов. Цель исследования — оценить состав микробиома крови пациентов с атеросклерозом, сравнить его с микрофлорой и микробиомом атеросклеротических бляшек, а также выявить общие таксоны для микробиомов крови и атеросклеротических бляшек и провести корреляционный анализ различных параметров крови и мочи у обследованных пациентов со структурой «ядра» бактериального сообщества крови.

Материал и методы

В исследование включено 24 пациента (19 мужчин и 5 женщин) в возрасте от 33 лет до 81 года (средний возраст $64,1 \pm 9,8$ года) с атеросклерозом общих сонных артерий, подтвержденным данными ультразвуковой доплерографии сосудов, находящихся на лечении в отделениях кардиологии и сосудистой хирургии Межрегионального клинико-диагностического центра (г. Казань). Все пациенты имели нормальную температуру тела и не принимали антибиотики. Основные характеристики участников исследования представлены в табл. 1.

Образцы венозной крови отбирали перед операцией в асептических условиях с использованием вакуумных пробирок. Первый, второй и третий образцы хранили при комнатной температуре и анализировали в течение двух часов. Первые образцы крови добавляли к 3,2 % цитрата натрия (9 : 1 по объему) в пробирки

Таблица 1
Некоторые характеристики пациентов с атеросклерозом

Table 1

Some characteristics of patients with atherosclerosis

Показатель	Значение
Пациенты, <i>n</i>	24
Возраст, лет	$64,1 \pm 9,8$
Мужчины/женщины	19/5
Индекс массы тела, кг/м ²	$28,36 \pm 9,2$
Курение, <i>n</i> (%)	9 (37,5)
Диабет, <i>n</i> (%)	9 (37,5)
Гипертония, <i>n</i> (%)	24 (100)
Инфаркт миокарда, <i>n</i> (%)	0 (0)
Инсульт, <i>n</i> (%)	4 (16,7)
Прием статинов, <i>n</i> (%)	13 (54,2)
Антиагрегантная терапия, <i>n</i> (%)	18 (75)
Атеросклероз брахиоцефальных артерий, <i>n</i> (%)	24 (100,0)
Атеросклероз коронарных артерий, <i>n</i> (%)	8 (33,3)
Атеросклероз артерий нижних конечностей, <i>n</i> (%)	4 (16,7)
Генерализованный атеросклероз, <i>n</i> (%)	4 (16,7)

S-Monovette (Sarstedt, Германия), а затем центрифугировали при 1500 g в течение 5 минут для получения богатой тромбоцитами плазмы с целью проведения в дальнейшем коагулологических тестов. Плазму переносили в чистые пробирки и центрифугировали при 1700–1900 g в течение 15 минут. Вторые образцы крови стабилизировали трикальевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (К3-EDTA) и использовали для гематологических тестов. Образцы нестабилизированной цельной крови тщательно перемешивали с шариками, покрытыми активатором свертывания (Sarstedt, Германия), оставляли на 20–30 минут при 37 °C, чтобы обеспечить свертывание, с последующим этапом центрифугирования при 2000 g в течение 10 минут для получения сыворотки, которую в дальнейшем использовали в биохимических анализах. Четвертый и пятый образцы крови брали в вакуумные пробирки с К3-EDTA, один помещали в стакан со льдом, в последующем в нем определяли содержание гомоцистеина, а другой немедленно замораживали и хранили при –70 °C в морозильной камере, затем использовали для экстракции ДНК.

В образцах свежей цитратной плазмы на автоматическом коагулометре Sysmex CA-1500 (Sysmex, Япония) определяли коагулологические показатели: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), международ-

ное нормализованное отношение (МНО), тромбиновое время и концентрацию фибриногена.

Общий анализ крови с подсчетом клеток проводили в образцах цельной крови с КЗ-ЭДТА на гематологическом анализаторе ABX Pentra 60 (Horiba, Япония). Концентрацию глюкозы, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), креатинина, мочевины, альбумина, общего белка, общего билирубина, общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности, триглицеридов, С-реактивного белка (СРБ) измеряли с помощью анализатора Advia 1200 (Siemens, Германия). На анализаторе газов и электролитов крови Stat Profile pHox Ultea (Nova Biomedical, США) определяли pH крови, содержание CO_2 . Иммунологическое исследование на гомоцистеин выполняли на хемилюминесцентном анализаторе Immulite 2000 Xpi (Siemens, Германия). pH мочи определяли на анализаторе мочи UroMettr 120 (Standart Diagnostics, Корея).

Извлечение культур из атеросклеротических бляшек. У 16 пациентов сегменты нестабильных атеросклеротических бляшек размером 1–2 см³ были удалены во время операции на сосудах шеи, немедленно отмыты в физиологическом растворе с гепарином и помещены в стерильный контейнер в асептических условиях. Как отрицательный контроль на стол в операционной комнате на весь период извлечения бляшки устанавливали «манекен бляшки» (стерильная марлевая салфетка), который впоследствии помещали в среду для контроля стерильности (СКС) и подвергали исследованию наряду с атеросклеротическими бляшками от пациентов. Образцы «манекена бляшки» и физиологического раствора с гепарином были предусмотрены для всех образцов в качестве контроля их загрязнения микрофлорой кожи и доставлялись в лабораторию параллельно с каждым образцом атеросклеротической бляшки. После операции все полученные образцы не контактировали с какими-либо потенциальными загрязнителями, и их немедленно переносили в бактериологическую лабораторию.

В ламинарном шкафу (2-го класса микробиологической защиты) атеросклеротическую бляшку отмывали (соотношение 1 : 10) в физиологическом растворе при интенсивном встряхивании на вортексе Microspin FV-2400 (BIOSAN, Латвия), затем помещали на дно пробирки с 9 мл среды СКС и 1 мл промывной жидкости, засекали глубинно в среду СКС и 0,1 мл поверхность на чашки с кровяным агаром и агаром Шедлера (BioRad, Франция). Посевы на плотных питательных средах инкубировали 14 суток при 35 °C: на кровяном агаре — в аэробных условиях, на агаре Шедлера — в анаэробных

условиях с генератором анаэробной атмосферы GENbox anaer (BioMeieux, Франция). Каждый анализ сопровождался контрольным посевом 1 мл образца раствора с гепарином из операционной и 1 мл физиологического раствора из посевного бокса бактериологической лаборатории в пробирки с СКС в соотношении 1 : 10, а также образца «манекена бляшки». Инкубацию на среде СКС проводили при $+35 \pm 2$ °C в аэробных условиях до 60 суток. При появлении в среде СКС видимых признаков роста выполняли пересев на кровяной агар и агар Шедлера с 5 % дефибринированной кровью барана. При наличии роста колоний на плотных питательных средах идентификацию и определение чувствительности аэробных культур проводили с помощью комбинированных панелей (Хромогенная панель для идентификации грампозитивных бактерий, комбинированная с антибиотиками тип 20, SIMAS, США) на автоматическом микробиологическом анализаторе WalkAway (SIMAS, США). Анаэробные культуры идентифицировали с помощью наборов АНАЭРОтест (Лахема, Чехия).

Предобработка образцов крови для экстракции ДНК. Образцы размораживали при комнатной температуре и центрифугировали (3000 об/мин), плазму удаляли. Осадок форменных элементов встряхивали и готовили аликвоты.

Экстракцию ДНК и секвенирование генов *16S rPHK* проводили следующим образом: тотальную геномную ДНК из образцов крови человека экстрагировали с помощью набора QIAamp BiOstic Bacteremia DNA Kit Qiagen (Qiagen, Германия). Целостность восстановленной геномной ДНК оценивали электрофорезом в агарозном геле, концентрацию ДНК определяли с помощью набора для анализа Qubit dsDNA BR и флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Все экстракты ДНК хранили при -20 °C до дальнейшей обработки. Перед амплификацией и секвенированием генов *16S rPHK* осуществляли подготовку метагеномных библиотек согласно протоколу «Preparing 16S Ribosomal RNA Gene Amplicons for the Illumina MiSeq System». Амплификацию V3-V4 региона *16S rPHK* проводили с использованием универсальных прокариотических праймеров, как описано ранее (Ziganshina et al., 2020) [9]. Секвенирование выполняли на платформе Illumina MiSeq (США) согласно инструкции производителя (режим парного чтения 300 пар нуклеотидов). Считанные данные обрабатывали и анализировали методами филогенетических и операционных таксономических единиц (OTE) в программе Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) версии 1.9.1 (<http://qiime.org/>) (Caporaso et al., 2010) [10] в соответствии с протоколом. Считывания с парных

концов объединяли, а затем обрабатывали для удаления данных о низкокачественной и химерной последовательности. Шаг разрежения был выполнен для уменьшения неоднородности глубины секвенирования между образцами. После кластеризации последовательностей обработки в ОТЕ с уровнем идентичности последовательностей 97 % использовали последнюю версию базы данных GreenGenes и RDP classifier.

Статистическая обработка результатов. Непрерывные переменные представлены в виде среднего арифметического значения и ошибки среднего арифметического ($M \pm m$), номинальные данные – в виде относительных частот объектов исследования (n , %). При решении задач корреляционного анализа использовали методы непараметрической статистики, что было обусловлено шкалами измерения данных и малым объемом выборки ($n = 24$). Для определения

тесноты связи между показателями использовали метод ранговой корреляции Спирмена (коэффициент r). Корреляции считали значимыми на 5%-м уровне значимости ($p < 0,05$).

Результаты

В общей сложности 788 140 бактериальных последовательностей без химер были получены после обработки из двадцати четырех образцов (в табл. 2 образцы пронумерованы сочетанием арабских цифр и латинских букв МуВ или МВ). Число прореженных считываний варьировало от 9715 до 10 407 на образец (см. табл. 2). Большинство полученных последовательностей было классифицировано как принадлежащие к *Proteobacteria* (73,9 %), *Actinobacteria* (11,4 %), *Bacteroidetes* (2,8 %), *Cyanobacteria* (1,3 %), *Firmicutes* (1,1 %), *Fusobacteria* (0,7 %) (рис. 1).

Таблица 2

Альфа-разнообразие бактериального сообщества в образцах крови у пациентов с атеросклерозом

Table 2

Alpha diversity of the bacterial community in blood samples of patients with atherosclerosis

Образец	Число считываний без химер	Число прореженных считываний	Наблюдаемые ОТЕ*	Индекс Chao1	Индекс Shannon	Индекс Simpson
1МуВ	32365	9895	170	221,11	5,24	0,94
2МВ	36958	10070	169	201,67	5,16	0,94
2МуВ	11474	10172	246	302,45	5,25	0,94
3МВ	32462	10126	134	171,84	4,76	0,93
3МуВ	49162	9909	109	140,17	4,54	0,91
4МВ	15819	10005	169	194,8	4,82	0,92
4МуВ	36738	10019	127	139,19	4,77	0,92
5МВ	22324	9946	147	179,22	4,88	0,94
5МуВ	48794	9792	146	205,11	5,06	0,94
6МуВ	10237	10237	185	224,6	5,15	0,94
7МВ	49709	9921	108	166,24	4,42	0,9
8МВ	56900	9715	101	136	4,63	0,92
10МВ	33304	10112	207	262,1	5,52	0,95
11МВ	47294	9862	143	194,13	5,09	0,93
12МВ	37648	10050	132	204,55	4,54	0,91
13МВ	15053	10365	142	173,14	4,72	0,93
14МВ	25061	10049	245	299,81	5,36	0,95
15МВ	40488	10217	147	198,48	5,03	0,94
17МВ	23723	10112	201	238,12	4,76	0,93
18МВ	27390	10082	200	293,97	5,06	0,93
20МВ	20997	10015	177	234,04	5,1	0,94
22МВ	26156	10133	154	197,97	4,96	0,93
23МВ	37835	10407	109	133,47	5,08	0,94
24МВ	50249	10160	126	169,75	4,9	0,94

* ОТЕ – операционные таксономические единицы.

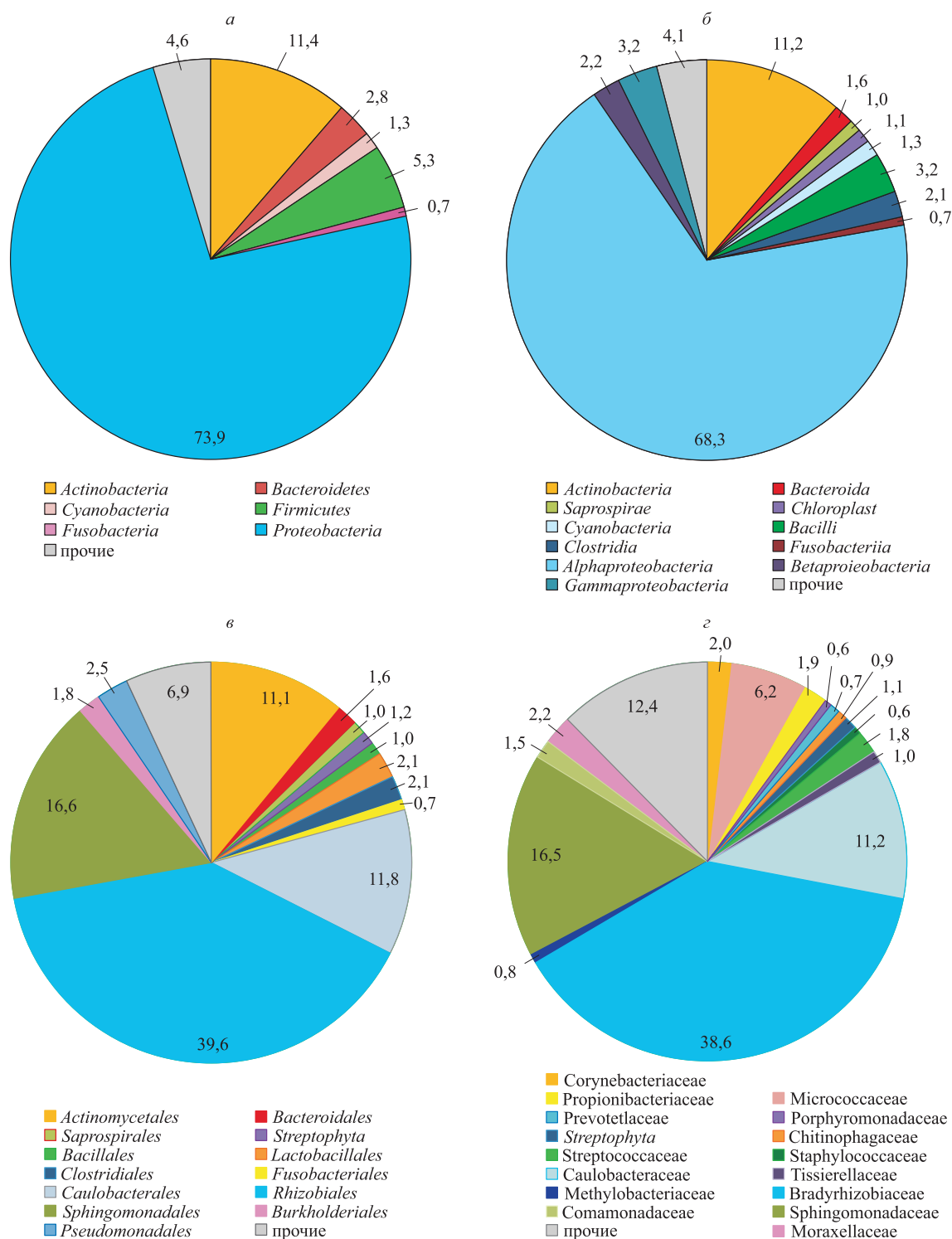


Рис. 1. Таксономическая классификация полученных бактериальных считываний в образцах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий на уровне типа (а), класса (б), порядка (в), семейства (г) (эти данные показывают более 0,5 %). Представители, на долю которых приходится менее 0,5 % всех зашифрованных последовательностей, объединены в группу «прочие»

Fig. 1. The taxonomic classification of all obtained bacterial readings in blood samples of patients with atherosclerosis of carotid arteries at the level of phylum (a), class (б), order (в), family (г) (these data show more than 0.5 %). Representatives accounting for less than 0.5 % of all encoded sequences were grouped into a group

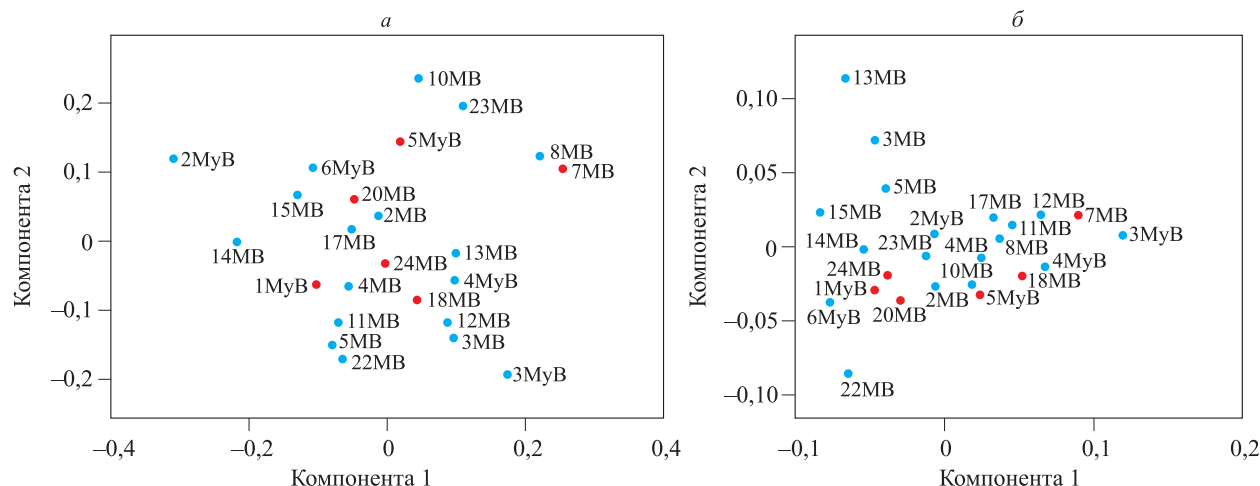


Рис. 2. Многопараметрическое сравнение образцов методом главных компонент по невзвешенным (а) и взвешенным (б) данным (синие кружки – мужчины, красные – женщины)

Fig. 2. Multivariate comparison of samples by the method of principal components on unweighted data (a) and weighted data (b) (blue circles – men, red circles – women)

Различия в общем составе бактериально-го сообщества, основанные на невзвешенных и взвешенных измерениях расстояния UniFrac (β -разнообразие), сравнивали во всех образцах пациентов (рис. 2). В соответствии с анализом основных координат (невзвешенные и взвешенные метрики расстояния UniFrac) почти все проанализированные образцы, полученные от пациентов женского пола, были близко расположены на графиках PCoA с группировкой друг с другом. В свою очередь, некоторые образцы, полученные от мужчин, были относительно близки друг к другу, тогда как другие образцы не были сгруппированы (см. рис. 2). Полученные результаты показывают, что состав бактериальных сообществ в некоторых образцах крови существенно не различается, в то время как в других образцах выявлены различные бактериальные ассоциации.

Примененный подход секвенирования позволил обнаружить, что кровь при атеросклерозе не является стерильной (см. рис. 1). На уровне фил (phyla) в крови всех обследованных пациентов обнаружены гены *16S pPHK Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*; гены *16S pPHK Cyanobacteria* присутствовали в 87,5 %, а *Fusobacteria* и других – в 83,3 % образцов.

Нами осуществлен поиск таксонов, присутствующих во всех образцах крови пациентов с атеросклерозом, составивших «ядро» бактериального сообщества крови. В него вошли 7 таксонов: неидентифицированные представители семейства *Bradyrhizobiaceae* (31–51,9 %),

род *Sphingomonas* (8,9–25,6 %), семейства *Caulobacteraceae* (6,4–16,7 %), *Micrococcaceae* (2,6–9,9 %), вид *Propionibacterium acnes* (0,7–3,9 %), род *Bradyrhizobium* (0,2–0,7 %), а также неидентифицированные представители порядка *Caulobacterales* (0,1–1,2 %). Представители рода *Staphylococcus* обнаружены в 20 (83,3 %) образцах крови с массивностью 0–2,2 % микробиома крови. Доля таксонов, составляющих «ядро» бактериального сообщества крови, и доля *Staphylococcus* в микробиоме крови пациентов с атеросклерозом представлены в табл. 3.

Представители таксонов, составляющие бактериальное «ядро» микробного сообщества крови, занимали от 67,7 до 87,5 % таксонов микробного сообщества, причем минимальный объем бактериального «ядра» (67,7 %) был представлен в 1-м образце (13MB), 70–79 % бактериального «ядра» содержали 14 образцов и 9 образцов имели в своем микробном составе 80–87,5 % таксонов, относящихся к бактериальному «ядру». Таким образом, 37,5 % образцов крови имели очень высокую (более 80 %) представленность таксонов бактериального «ядра» в микробиоме крови, 58,3 % образцов крови имели высокую (более 70 %) представленность таксонов, принадлежащих к бактериальному «ядру» микробиома крови, и 4,2 % – среднюю (более 60 %) представленность.

Гены *16S pPHK* следующих таксонов обнаружены не во всех образцах крови пациентов с атеросклерозом, а именно: недифференцированные виды рода *Corynebacterium* (95,3 %), недифференцированные виды порядка *Streptophyta*

Таблица 3

Доля таксонов в микробном сообществе крови, составивших «ядро» бактериального сообщества крови, и доля *Staphylococcus* в микробиоме крови у пациентов с атеросклерозом

Table 3

Share of taxons in the blood microbial community that formed the «core» of the blood bacterial community and the share of *Staphylococcus* in the blood microbiome of patients with atherosclerosis

Образец	Доля в микробном сообществе крови, %								
	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Staphylococcus</i>	Micrococaceae	<i>Caulobacterales</i>	Caulobacteraceae	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Sphingomonas</i>	Сумма бактериального «ядра»
1MyB	1,1	0,7	5,0	0,4	9,2	37,5	0,2	16,1	70,6
2MB	2,0	2,2	6,0	0,3	8,3	41,4	0,5	18,4	78,9
2MyB	1,1	0,5	4,3	0,7	9,4	38,4	0,4	18,1	73,6
3MB	1,6	1,2	2,9	0,1	15,9	34,0	0,3	25,6	81,9
3MyB	0,7	0,6	4,3	1,2	13,2	51,9	0,5	11,2	83,7
4MB	2,0	0,3	4,1	0,7	7,1	46,5	0,2	15,9	78,5
4MyB	1,8	0,4	8,4	0,8	12,8	45,1	0,4	8,9	80,0
5MB	1,0	2,2	8,9	0,4	16,7	31,6	0,5	20,0	80,2
5MyB	1,1	0,3	6,3	0,9	15,5	38,8	0,4	13,3	77,4
6MyB	3,3	0,5	5,5	0,5	6,4	37,8	0,2	16,4	73,4
7MB	1,4	0,8	4,0	0,9	10,1	51,4	0,5	17,9	87,5
8MB	2,0	0,0	6,3	0,4	12,0	42,6	0,3	18,2	83,9
10MB	2,3	0,0	2,6	1,2	14,8	38,9	0,2	16,6	78,8
11MB	0,9	0,4	4,4	1,0	9,5	41,2	0,7	13,0	71,6
12MB	1,2	0,1	8,0	0,6	8,2	48,4	0,4	18,7	86,8
13MB	1,3	0,1	5,1	0,6	7,3	31,0	0,3	20,8	67,7
14MB	1,8	0,0	4,6	0,5	13,9	34,5	0,4	15,7	73,1
15MB	3,4	1,2	7,0	0,4	13,0	32,4	0,4	19,7	79,8
17MB	3,2	0,9	5,5	0,7	12,5	41,7	0,3	19,6	86,6
18MB	1,6	1,4	4,6	0,6	11,5	43,9	0,3	14,0	78,1
20MB	2,7	0,9	8,7	0,7	11,7	36,8	0,2	13,1	76,7
22MB	2,7	0,0	9,4	0,2	6,8	39,3	0,3	16,3	77,6
23MB	3,9	0,3	9,9	0,8	10,2	36,3	0,7	19,7	85,3
24MB	2,3	0,1	3,1	0,9	14,1	35,6	0,5	16,5	75,3
Пределы обнаружения	0,7–3,9	0–2,2	2,6–9,9	0,1–1,2	6,4–16,7	31–51,9	0,2–0,7	8,9–25,6	67,7–87,5

(87,5 %), вид *Staphylococcus epidermidis* (83,3 %), недифференцированные виды рода *Streptococcus* (95,8 %), недифференцированные виды семейств Caulobacteraceae (87,5 %), Sphingomonadaceae (91,7 %) и Comamonadaceae (95,8 %).

Культуральное исследование образцов атеросклеротических бляшек выявило рост бактерий в 75 % образцов (12 из 16): *Propionibacterium acnes* обнаружена в 43,8 % бляшек (7 из 16), *Staphylococcus epidermidis* — в 18,8 % (3 из 16), *Staphylococcus capitis* — в 6,3 % (1 из 16), *Staphylococcus saccharolyticus* — в 6,3 % (1 из 16).

Далее нами проведен сравнительный анализ таксонов, составляющих «ядро» бактериального сообщества крови и «ядро» бактериального сообщества атеросклеротических бляшек, исследованного нами ранее [8]. Два таксона были общими для бактериальных «ядер» микробного сообщества атеросклеротических бляшек и крови: *Propionibacterium acnes* и неидентифицированные представители семейства Bradyrhizobiaceae.

Исследование связи различных параметров крови пациентов со структурой «ядра» бактериального сообщества крови позволило уста-

новить, что численность нескольких таксонов коррелировала с разными параметрами крови. Связь умеренной тесноты ($0,5 \leq |r| < 0,7$) при 95%-м уровне значимости ($p < 0,05$) обнаружена между следующими показателями: численность *Propionibacterium acnes* и концентрация альбумина ($r = -0,64$), мочевины ($r = -0,49$), креатинина ($r = -0,55$); доля в микробном сообществе неклассифицированных представителей *Caulobacterales* и уровень гомоцистеина ($r = -0,51$), АЧТВ ($r = -0,6$); численность *Bradyrhizobiaceae* и содержание АСТ ($r = -0,54$); доля в микробном сообществе рода *Sphingomonas* и прием пациентами статинов ($r = -0,48$); численность рода *Staphylococcus* и рН крови ($r = 0,61$), АЧТВ ($r = 0,65$), численность *Staphylococcus epidermidis* и величина МНО ($r = -0,61$).

В нашем более раннем исследовании для структуры «ядра» бактериального сообщества атеросклеротических бляшек также была установлена связь с различными параметрами крови пациентов. Выявлены коэффициенты ранговой корреляции, показывающие весьма высокую тесноту связи между численностью видов *Propionibacterium acnes* и содержанием триглицеридов ($r = 0,9$), тогда как для численности неидентифицированных представителей семейства *Comamonadaceae* и рода *Curvibacter* установлен отрицательный характер связи с концентрацией триглицеридов ($r = -0,9$). Обнаружена статистически значимая зависимость между долей в микробном сообществе *Propionibacterium acnes* и количеством эозинофилов ($r = 0,5$), антиагрегантной терапией ($r = 0,5$); между численностью *Staphylococcus* и уровнем АЛТ ($r = 0,68$), общего белка ($r = -0,57$). Численность неклассифицированных представителей семейства *Rhodospirillaceae* коррелировала с концентрацией мочевины ($r = 0,48$), видов *Burkholderia* — с уровнем общего билирубина ($r = -0,57$) и протромбиновым временем ($r = -0,53$).

Обсуждение

Подход секвенирования позволил обнаружить, что кровь при атеросклерозе не является стерильной. В настоящем исследовании установлено присутствие «ядра» бактериального сообщества крови, в которое вошли 7 таксонов: неидентифицированные представители семейств *Bradyrhizobiaceae*, *Caulobacteraceae*, *Micrococaceae*, *Sphingomonas*, вид *Propionibacterium acnes*, род *Bradyrhizobium*, а также неидентифицированные представители порядка *Caulobacterales*. Представители таксонов, составляющие бактериальное «ядро» микробного сообщества крови,

занимали от 67,7 до 87,5 % таксонов микробного сообщества, причем более одной трети образцов крови имели более чем 80%-ю представленность бактериального «ядра» в микробиоме крови, а более половины образцов крови — 70%-ю. Наше исследование впервые сообщает о микробиоме крови пациентов с атеросклерозом, и обнаружено присутствие нескольких таксонов во всех образцах крови. Интересно, что о наличии «ядра» бактериального сообщества в атеросклеротических бляшках впервые сообщили O. Koren et al. [11]. Наше более раннее исследование [8] также обнаружило присутствие такого «ядра» в микробиоме атеросклеротических бляшек сонных артерий, которое совпало с результатами O. Koren et al. [11] по двум таксонам: *Propionibacteriaceae* и *Burkholderia*. Присутствие в микробиоте атеросклеротических бляшек *Propionibacterium acnes* также зарегистрировано в нескольких работах [11–13]. Наличие в атероматозных тканях бактериальных отпечатков 16S рДНК может быть просто связано с тем, что ДНК бактерий содержится в макрофагах, несущих фагоцитированные бактерии с другого участка инфекции. Для выполнения постулата Коха необходимо продемонстрировать культивирование бактерий из пораженной ткани, чтобы обеспечить механистические данные, связывающие инфекционные организмы с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Наше исследование обнаружило жизнеспособные культуры *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus* в образцах биоптатов атеросклеротических бляшек, обеспечив механистическую связь микроорганизмов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Жизнеспособные *Propionibacterium acnes* и виды бактерий *Staphylococcus* выявлены в исследовании B. Rafferty et al. [14], B.B. Lanter и D.D. Davies [15].

Мы не имели возможности провести секвенирование образцов крови здоровых доноров и сравнить микробиом их крови и микробиом крови пациентов с атеросклерозом. Однако в 2016 г. S. Paise et al. [16] выполнили комплексное исследование микробиома крови от здоровых доноров, оцененное с помощью 16S целевого метагеномного секвенирования, не обнаружившее присутствие генов *16S pPHK* семейства *Propionibacteriaceae*. Гены *16S pPHK* *Propionibacterium acnes* найдены в микробиомах всех атеросклеротических бляшек в уже упомянутых выше исследованиях [8, 11], тогда как в другой работе — только в 26,6 % образцов [15].

Если провести сравнение микробиома крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий, выполненного в данной работе, и микробиома атеросклеротических бляшек сонных артерий,

исследованного нами ранее [8], общими для их бактериальных «ядер» являются два таксона: *Propionibacterium acnes* и *Bradyrhizobiaceae*.

Проведенное исследование показало полное совпадение обнаружения *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus epidermidis* у одних и тех же индивидов как в атеросклеротических бляшках культуральным методом, так и в крови методами секвенирования. Оба микроорганизма обитают на коже и слизистых оболочках, присутствуют в кишечнике и ротовой полости человека и могут попадать в кровь при жевании, чистке зубов, стоматологических манипуляциях, оперативных вмешательствах. Оба микроорганизма являются комменсалами, но также способны образовывать биопленки, вызывать широкий спектр заболеваний у человека, в том числе поражения сердечно-сосудистой системы [17, 18].

Метод секвенирования крови пациентов с атеросклерозом дает положительный результат в отношении генов *16S rRNA Propionibacterium acnes* в 100 % образцов, а *Staphylococcus epidermidis* — в 83,3 %. *Propionibacterium acnes* встречается во всех микробиомах атеросклеротических бляшек, но не все атеросклеротические бляшки имеют таксоны рода *Staphylococcus*. Недавнее исследование показало не только присутствие биопленок *Propionibacterium acnes* на поверхности бляшки, но и внедрение на всю толщину ткани вплоть до адвентиции [15]. В экспериментах *in vitro* было вызвано диспергирование (скоординированное высвобождение из матрикса дифференцированных подвижных хемотаксических бактерий и их распространение на новые локусы колонизации) *Propionibacterium acnes* из биопленок в ответ на стресс, когда происходит увеличение концентрации свободного железа из-за взаимодействия норэпинефрина и связанного с железом трансферрина. Данное событие может связывать стресс с сердечным приступом и инсультом. В результате диспергирования биопленок происходило повышение активности ферментов, таких как липазы, протеазы, гиалуронатлиазы, высвобождаемых из клеток биопленки *Propionibacterium acnes* [15]. Липазы PPA2105 вызывают расщепление триацилглицерина, что приводит к накоплению свободных жирных кислот, которые, как было установлено, стимулируют воспаление [19, 20].

В более раннем исследовании [8] мы установили зависимость между численностью видов *Propionibacterium acnes* в атеросклеротических бляшках и содержанием в крови триглицеридов ($r = 0,9$) и эозинофилов ($r = 0,49$), приемом антиагрегантной терапии ($r = 0,49$). С другой стороны, *Propionibacterium acnes* продуцируют сиалидазу [21], позволяющую утилизировать си-

аловую кислоту в качестве источника энергии. Экспериментально установлено, что нативные липопротеины здоровых лиц после десалирирования бактериальной нейраминидазой приобретают атерогенные свойства [22]. В.В. Lanter et al. высказали предположение, что повреждение тканей вследствие активности *Propionibacterium acnes* и других бактерий, связанных с атеросклеротическими бляшками, может влиять на стабильность атеросклеротических поражений, способствовать разрыву бляшек и атерогенезу [15].

Заключение

В нашем исследовании впервые проанализирован микробиом крови пациентов с атеросклерозом, обнаружены жизнеспособные культуры *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus* в образцах биоптатов атеросклеротических бляшек, что подтверждает механистическую связь микроорганизмов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Общими таксонами для микробиомов крови и атеросклеротических бляшек являются *Propionibacterium acnes* и *Bradyrhizobiaceae*. Можно предположить, что вид *Propionibacterium acnes* является специфичным таксоном и атеросклеротических бляшек сонных артерий, и крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий, однако требуется проведение дополнительных исследований этиологической значимости микробного фактора в формировании атеросклеротических бляшек.

Литература

1. Benjamin E.J., Muntner P., Alonso A., Bittencourt M.S., Callaway C.W., Carson A.P., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., Das S.R., Delling F.N., Djousse L., Elkind M.S.V., Ferguson J.F., Fornage M., Jordan L.C., Khan S.S., Kissela B.M., Knutson K.L., Kwan T.W., Lackland D.T., Lewis T.T., Lichtman J.H., Longenecker C.T., Loop M.S., Lutsey P.L., Martin S.S., Matsushita K., Moran A.E., Mussolino M.E., O'Flaherty M., Pandey A., Perak A.M., Rosamond W.D., Roth G.A., Sampson U.K.A., Satou G.M., Schroeder E.B., Shah S.H., Spartano N.L., Stokes A., Tirschwell D.L., Tsao C.W., Turakhia M.P., VanWagner L.B., Wilkins J.T., Wong S.S., Virani S.S.; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2019; 139 (10): e56–e528. doi: 10.1161/CIR.0000000000000659
2. Morbidity of the population by main classes of diseases in 2000-2013. Federal State Statistics Service. Electronic resource: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/

- healthcare. (In Russ.) Заболеваемость населения по основным классам болезней в 2000–2013 гг. Федеральная служба государственной статистики. Электронный ресурс: http://www.gks.ru/wps/wcm/connect/rosstat_main/rosstat/ru/statistics/population/healthcare
3. Healthcare in Russia. Statistical book. Moscow: Rosstat, 2019. P. 170. ISBN 978-5-89476-470-2. (In Russ.) Здравоохранение в России. Статистический сборник. М.: Росстат, 2019. 170 с.
4. Campbell L.A., Rosenfeld M.E. Infection and atherosclerosis development. *Arch. Med. Res.*, 2015; 46: 339–350. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.05.006
5. Budzyński J., Wiśniewska J., Ciecierski M., Kędzia A. Association between bacterial infection and peripheral vascular disease: a review. *Int. J. Angiol.*, 2016; 25 (1): 3–13. doi: 10.1055/s-0035-1547385
6. Joshi C., Bapat R., Anderson W., Dawson D., Hijazi K., Cherukara G. Detection of periodontal microorganisms in coronary atheromatous plaque specimens of myocardial infarction patients: A systematic review and meta-analysis. *Trends Cardiovasc. Med.*, 2019; 31 (1): 69–82. doi: 10.1016/j.tcm.2019.12.005
7. Kozarov E. Bacterial invasion of vascular cell types: vascular infectology and atherogenesis. *Future Cardiol.*, 2012; 8 (1): 123–138. doi: 10.2217/fca.11.75
8. Ziganshina E.E., Sharifullina D.M., Lozhkin A.P., Khayrullin R.N., Ignatyev I.M., Ziganshin A.M. Bacterial communities associated with atherosclerotic plaques from Russian individuals with atherosclerosis. *PLoS One*, 2016; 11 (10): e0164836. doi: 10.1371/journal.pone.0164836
9. Ziganshina E.E., Sagitov I.I., Akhmetova R.F., Saleeva G.T., Kiassov A.P., Gogoleva N.E., Shagimardanova E.I., Ziganshin A.M. Comparison of the microbiota and inorganic anion content in the saliva of patients with gastroesophageal reflux disease and gastroesophageal reflux disease-free individuals. *Biomed. Res. Int.*, 2020; 2020: 2681791. doi: 10.1155/2020/2681791
10. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 2010; 7 (5): 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
11. Koren O., Spor A., Felin J., Fåk F., Stombaugh J., Tremaroli V., Behre C.J., Knight R., Fagerberg B., Ley R.E., Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2011; 108 (1): 4592–4598. doi: 10.1073/pnas.1011383107
12. Armingohar Z., Jørgensen J.J., Kristoffersen A.K., Abesha-Belay E., Olsen I. Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis. *J. Oral Microbiol.*, 2014; 6. doi: 10.3402/jom.v6.23408
13. Serra W., Filho S., Casarin R.C.V., Nicolela E.L.Jr., Passos H.M., Sallum A.W., Gonçalves R.B. Microbial diversity similarities in periodontal pockets and atheromatous plaques of cardiovascular disease patients. *PLoS One*, 2014; 9 (10): e109761. doi: 10.1371/journal.pone.0109761
14. Rafferty B., Jönsson D., Kalachikov S., Demmer R.T., Nowygrod R., Elkind M.S.V., Bush H.Jr., Kozarov E. Impact of monocytic cells on recovery of uncultivable bacteria from atherosclerotic lesion. *J. Int. Med.*, 2011; 270 (3): 273–280. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02373.x
15. Lanter B.B., Davies D.G. Propionibacterium acnes recovered from atherosclerotic human carotid arteries undergoes biofilm dispersion and releases lipolytic and proteolytic enzymes in response to norepinephrine challenge *in vitro*. *Infect Immun.*, 2015; 83 (10): 3960–3971. doi: 10.1128/IAI.00510-15
16. Paissé S., Valle C., Servant F., Courtney M., Burcellin R., Amar J., Lelouvier B. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*, 2016; 56 (5): 1138–1147. doi: 10.1111/trf.13477
17. Guio L., Sarriá C., de las Cuevas C., Gamallo C., Duarte J. Chronic prosthetic valve endocarditis due to Propionibacterium acnes: an unexpected cause of prosthetic valve dysfunction. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2009; 62 (2): 167–177. doi: 10.1016/s1885-5857(09)71535-x
18. El Rafei A., Desimone D.C., Sohail M.R., Desimone C.V., Steckelberg J.M., Wilson W.R., Badour L.M. Cardiovascular implantable electronic device infections due to Propionibacterium species. *Pacing Clin. Electrophysiol.*, 2016; 39 (6): 522–530. doi: 10.1111/pace.12845
19. Jappe U. Pathological mechanisms of acne with special emphasis on Propionibacterium acnes and related therapy. *Acta Derm Venereol.*, 2003; 83 (4): 241–248. doi: 10.1080/00015550310016463
20. Coenye T., Peeters E., Nelis H.J. Biofilm formation by Propionibacterium acnes is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors. *Res. Microbiol.*, 2007; 158 (4): 386–392. doi: 10.1016/j.resmic.2007.02.001
21. Christensen G.J.M., Bruggemann H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Benef. Microbes*, 2014; 5 (2): 201–215. doi: 10.3920/BM2012.0062
22. Орехов А.Н., Карагодин В.П., Мельниченко А.А., Кириченко Т.В., Смутова В.А., Чернова Е.В., Сафонова В.М., Калабушев С.Н., Пшежецкий А.В. Силомика и атеросклероз. *Фундаментальные науки и практика*, 2010; 1 (4): 59–65. (In Russ.) Orekhov A.N., Karagodin V.P., Mel'nichenko A.A., Kirichenko T.V., Smutova V.A., Chernova E.V., Safonova V.M., Kalabushev S.N., Pshezhetskiy A.V. Sialomica and atherosclerosis. *Fundamental Sciences and Practice*, 2010; 1 (4): 59–65.

Сведения об авторах:

Диляра Марсумовна Шарифуллина, зав. бактериологической лабораторией, врач-бактериолог, ORCID: 0000-0001-5493-9644, e-mail: dilmag57@mail.ru

Оскар Кимович Поздеев, д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии, ORCID: 0000-0002-6855-3387, e-mail: pozdeevoskar@rambler.ru

Рустем Наилевич Хайруллин, д-р мед. наук, заслуженный врач РТ, чл.-корр. АН РТ, генеральный директор, ORCID: 0000-0002-2160-7720, e-mail: icdc@icdc.ru

Information about the authors:

Diliara M. Sharifullina, head of bacteriological laboratory, bacteriologist, ORCID: 0000-0001-5493-9644, e-mail: dilmag57@mail.ru

Oskar K. Pozdeev, doctor of medical science, professor, head of microbiology department, ORCID: 0000-0002-6855-3387, e-mail: pozdeevoskar@rambler.ru

Rustem N. Khayrullin, doctor of medical sciences, honored physician of the Republic of Tatarstan, corresponding member of the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan, Director General, ORCID: 0000-0002-2160-7720, e-mail: icdc@icdc.ru

Статья поступила 14.10.2021

После доработки 28.12.2021

Принята к печати 28.02.2022

Received 14.10.2021

Revision received 28.12.2021

Accepted 28.02.2022

